

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Regulação dos Níveis dos Transportadores de
Inositol nas Células de *Saccharomyces cerevisiae*
Tratadas com Peróxido de Hidrogénio**

Tomás José Ferreira da Rosa Serra dos Santos

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Regulação dos Níveis dos Transportadores de
Inositol nas Células de *Saccharomyces cerevisiae*
Tratadas com Peróxido de Hidrogénio**

Tomás José Ferreira da Rosa Serra dos Santos

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação Orientada pela Prof. Doutora Maria Luísa Cyrne

2014

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO TEÓRICA	1
I.1. Os transportadores de inositol de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Itr1p e Itr2p).....	3
I.1.1. Estrutura e função dos transportadores de inositol Itr1p e Itr2p.....	3
I.1.2. Regulação da expressão dos genes <i>ITR1</i> e <i>ITR2</i> a nível transcricional.....	8
I.1.3. Regulação do conteúdo de Itr1p.....	10
I.2. Modelo biológico da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
I.3. O peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂) e o <i>stress</i> oxidativo.....	14
I.3.1. O H ₂ O ₂ como indutor de <i>stress</i> oxidativo.....	14
I.3.2. O estado estacionário de H ₂ O ₂ como indutor de <i>stress</i> oxidativo.....	17
I.3.3. A adaptação ao H ₂ O ₂ em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
I.3.4. A regulação da expressão génica em condições de adaptação ao H ₂ O ₂ em estado estacionário.....	21
II. OBJECTIVOS	23
III. MATERIAIS E MÉTODOS	25
III.1. Materiais.....	25
III.2. Material biológico.....	26
III.3. Métodos Experimentais.....	26
III.3.1. Condições de crescimento.....	26
III.3.2. Curvas de Crescimento.....	27

III.3.3. Determinação das constantes de consumo de H ₂ O ₂ pelas células.....	27
III.3.4. Adaptação das células a 150 µM de H ₂ O ₂ em estado Estacionário.....	29
III.3.5. Quantificação dos transportadores Itr1-GFPp e Itr2-GFPp nas membranas e nas células totais.....	29
III.3.5.1. Obtenção dos extractos membranares.....	29
III.3.5.2. Obtenção dos extractos totais.....	30
III.3.5.3. Quantificação de proteínas pelo método de Peterson.....	31
III.3.6. Análise das proteínas por <i>Western Blot</i>	31
III.3.6.1. Separação das proteínas por SDS-PAGE.....	32
III.3.6.2. Transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose.....	33
III.3.6.3. Imunodeteção.....	34
III.3.7. Análise de amostras por microscopia de fluorescência.....	34
III.3.8. Determinação de cisteínas oxidadas utilizando MAL-PEG.....	35
III.3.9. Determinação da oxidação de cisteínas por imunoprecipitação e espectrometria de massa.....	37
III.3.9.1. Obtenção das células para preparação de extractos membranares para imunoprecipitar.....	37
III.3.9.2. Preparação do extracto proteico de membranas para imunoprecipitação.....	37
III.3.9.3. Precipitação do complexo proteína-anticorpo.....	38
III.3.9.4. Dissociação e análise.....	38
III.3.10. Quantificação de fluorescência das imagens através do programa ImageJ.....	39
III.3.11. Análise estatística.....	40

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
IV.1. Caracterização das estirpes <i>ITR1-GFP</i> e <i>ITR2-GFP</i>	42
IV.2. Otimização das condições para estabelecer o estado estacionário de H ₂ O ₂	46
IV.2.1. Consumo de H ₂ O ₂ pelas células	46
IV.2.2 Cálculo dos volumes de glucose oxidase e H ₂ O ₂ para estabelecer o estado estacionário de H ₂ O ₂	48
IV.3. Determinação dos níveis membranares e totais dos transportadores de inositol (Itr1-GFPp e Itr2-GFPp) por <i>Western Blot</i>	48
IV.4. Determinação da localização celular dos transportadores de inositol por microscopia de fluorescência	53
IV.5. Determinação dos níveis de oxidação do transportador de inositol Itr1-GFPp	58
IV.6. Determinação do estado de oxidação de cada resíduo de cisteína da Itr1-GFPp por homologia e espectrometria de massa	63
IV.6.1. Determinação da estrutura tridimensional da Itr1-GFPp através de modelação por homologia	63
IV.6.2. Determinação do estado de oxidação dos resíduos de cisteína da proteína Itr1-GFPp	66
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
VI. PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Luísa Cyrne pela transmissão de conhecimentos e experiência científica e grandemente pela paciência demonstrada quando as experiências não corriam tão bem. Agradeço também por contribuído para o meu desenvolvimento enquanto investigador científico e pela sua disponibilidade sempre que necessário.

À Professora Doutora Susana Marinho e ao Professor Doutor Fernando Antunes pelo seu contributo com sugestões e esclarecimentos durante todo o desenvolvimento do trabalho realizado.

Ao Professor Miguel Machuqueiro pelo seu inestimável contributo para o processo de modelação de proteínas por homologia.

Ao Doutor Gonçalo Costa pela sua contribuição na realização da espectrometria de massa.

Aos colegas do Grupo de Bioquímica de Oxidantes e Antioxidantes, nomeadamente o Valdir Semedo, a Carolina Camelo e a Tatiana Nobre pelo bom ambiente e diversão que alegravam qualquer dia no laboratório.

À minha família, por terem tido a paciência e compreensão necessárias para que me pudesse dedicar à realização deste projecto.

À Margarida pela sua paciência e dedicação. Por tudo o que não fizemos juntos para poder dedicar-me ao trabalho. Por estar sempre presente a ajudar quando precisava. Por ser a força que me ajudou a aguentar todo o trabalho realizado.

A todos os meus colegas da VicanTuna, pelo companheirismo e boa disposição que faziam esquecer qualquer dia menos bom e por estarem sempre presentes como ombro amigo quando um desabafo era necessário.

A todos um enorme obrigado!

Lista de abreviaturas e nomenclatura

A nomenclatura relativa à levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada ao longo do trabalho teve por base as normas presentes na literatura (Cherry 1995):

Estirpe selvagem – wt (*wild type*)

Gene – *ITR1*

Proteína – Itr1p

Estirpe mutante – *opi1Δ*

$^1\text{O}_2$ – dioxigénio singuleto

Ab_{s_{xxx}} – Absorvência a x nanómetros

ARTs – arrestinas

bHLH – do inglês, **b**asic **H**elix-**L**oop-**H**elix

BSA – albumina de soro bovino, do inglês, *Bovine Serum Albumin*

bZip – do inglês, **b**asic leucine **Z**ipper

Cat - catalase

CDP-DAG – difosfato de citidina-diacilglicerol

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTNB – ácido ditionitrobenzóico, do inglês, *DiThioNitroBenzoic acid*

DTT – ditionitroreitol

EDTA – do inglês, *EthyleneDiamine Tetracetic Acid*

FFAT – do inglês, *two phenylalanines (FF) in an Acidic Tract motif*

GO – glucose oxidase

GFP – do inglês, *Green Fluorescent Protein*

GPx – glutathione peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogénio

HO• - radical hidroxilo

IAM - iodoacetamida

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IP – solução tampão de imunoprecipitação

IP-I – solução tampão de imunoprecipitação com inibidores de proteases

MAL-PEG – maleimida metoxipolietilenoglicol

mRNA – RNA mensageiro

NADPH – fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma reduzida), do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced form)*

NEM – N-etilmaleimida

NMR – ressonância magnética nuclear, do inglês, **N**uclear **M**agnetic **R**esonance

O₂ – oxigénio molecular

O₂^{•-} - radical anião superóxido

OD – densidade óptica, do inglês, *Optical Density*

ONOO⁻ - peroxinitrito

ORF – do inglês, *Open Reading Frame*

PA – ácido fosfatídico

PAM – do inglês, *Point Accepted Mutation*

PBS - solução tampão de fosfato-salino

PC – fosfatidilcolina

PDME – fosfatidildimetiletanolamina

PE - fosfatidiletanolamina

PI – fosfatidilinositol

PIP – fosfato de fosfatidilinositol

PIP₂ – bifosfato de fosfatidilinositol

PMME – fosfatidilmonometiletanolamina

PS – fosfatidilserina

PSA – persulfato de amónia

PY – motivo de ligação à Rsp5p

RE – retículo endoplasmático

RID – domínio de interacção ao repressor

RNA – ácido ribonucleico

RNA Pol II – RNA polimerase II

RO[•] - radical alcóxido

ROO[•] - radical peróxido

ROOH – hidroperóxido orgânico

ROS – espécies reactivas de oxigénio, do inglês, *Reactive Oxygen Species*

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – do inglês, *Real Time Polymerase Chain Reaction*

SC – meio sintético completo

SDS – dodecilo sulfato sódico, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate*

SDS-PAGE – electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

SID – domínio de interacção com Sin3p

SOD – superóxido dismutase

SOD_{Cu/Zn}, SOD1 – superóxido dismutase de sobre-zinco

SOD_{Mn}, SOD2 – superóxido dismutase de manganês

UAS_{INO} – do inglês, *inositol-sensitive Upstream Activating Sequence*

Ub – ubiquitina

UV – ultravioleta

Vis – visível

TAD – domínio de activação de transcrição

TCA – ácido tricloroacético, do inglês, *TriChloroacetic Acid*

TEMED – N,N,N,N-tetraetilenodiamina

TFIIB – factor de transcrição IIB

TFK – solução tampão de fosfatos de potássio

TNE – solução tampão de Tris-NaCl-EDTA

TNE-I – solução tampão TNE com inibidores de proteases

Tris – tris-hidroximetilaminometano

YNB – do inglês, *Yeast Nitrogen Base*

YP – do inglês, *Yeast-Peptide*

YPD - do inglês, *Yeast-Peptide-Dextrose*

Resumo

O inositol é um precursor de vários fosfolípidos membranares em leveduras e tem um papel essencial na regulação genética em *Saccharomyces cerevisiae*. As duas vias de obtenção de inositol em leveduras são a biossíntese a partir de glucose-6-fosfato e o seu *uptake* extracelular, mediado por dois permeases de inositol, Itr1p e Itr2p, codificados respectivamente pelos genes *ITR1* e *ITR2*. Muitos genes envolvidos na biossíntese de fosfolípidos são regulados pelo inositol através da sequência UAS_{INO}, que se liga aos factores de ligação de DNA Ino2p-Ino4p e Opi1p, um regulador negativo de transcrição. O gene *ITR1* é também regulado pela presença de inositol.

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a taxa de difusão do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) através da membrana plasmática decresce durante a adaptação ao H₂O₂ (exposição a doses sub-letais de H₂O₂), tornando as células mais resistentes a uma exposição futura com doses letais de H₂O₂. Nestas condições genes diferentes contendo a sequência UAS_{INO} são reprimidos devido à activação do factor Opi1p que ocorre devido a uma alteração dos níveis de inositol. As células de *S. cerevisiae* apresentam uma diminuição dos níveis de inositol intracelular após o tratamento com H₂O₂.

Com o presente trabalho observou-se uma acumulação da Itr1-GFPp na membrana plasmática, quando as células de *S. cerevisiae* são tratadas com H₂O₂ em condições de adaptação, concomitantemente com uma inibição da internalização deste transportador. No caso da Itr2-GFPp observou-se que os níveis, quer membranares quer totais, eram mantidos quando as células são tratadas nas mesmas condições. Os dados preliminares obtidos relativamente ao grau de oxidação do transportador Itr1-GFPp indicam que 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário oxidam este transportador, impedindo o transporte de inositol para a célula, com uma acumulação na membrana plasmática, o que está de acordo a análise da estrutura tridimensional teórica da Itr1p.

Abstract

Inositol is a precursor of several membrane phospholipids in yeast and plays a key role in the genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. The two routes of inositol supply in yeast are biosynthesis from glucose-6-phosphate, and extracellular uptake, mediated by two permeases, Itr1p and Itr2p, encoded by the *ITR1* and *ITR2* genes, respectively. Many genes involved in phospholipid biosynthesis are regulated by inositol via the UAS_{INO} sequence, which is bind by Ino2p-Ino4p DNA binding factors and Opi1p, a negative regulator of transcription. The *ITR1* gene is also regulated by the presence of inositol.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the rate of hydrogen peroxide (H₂O₂) diffusion through the plasma membrane decreases during adaptation to H₂O₂ (exposure to sub-lethal doses of H₂O₂), rendering cells more resistant to further exposure to lethal doses of H₂O₂. In these conditions, different genes containing the UAS_{INO} sequence are repressed due to the activation of the repressor Opi1p that occurs due to an alteration of the inositol levels. The cells of the yeast *S. cerevisiae* show a decrease in the intracellular inositol levels after treatment with H₂O₂.

With the present work we observed an accumulation of the protein Itr1-GFPp in the plasma membrane, when *S. cerevisiae* cells are treated with H₂O₂ in adaptation conditions, concomitantly with an inhibition of the transporter internalization. When we studied Itr2-GFPp, we observed that its membrane and total levels remained unchanged when cells were treated in the same conditions. Preliminary data obtained relatively to the oxidation degree of the Itr1-GFPp shows that steady state of 150 μ M of H₂O₂ oxidizes this transporter, stopping the inositol transport to the cell, with a accumulation in the plasma membrane, which complies with the analysis of the theoretical tridimensional structure of Itr1p.

I. INTRODUÇÃO TEÓRICA

O mio-inositol (a forma mais abundante de inositol na natureza (Michell 2008), doravante apenas referido como inositol) é uma biomolécula envolvida numa série de processos celulares, tanto em eucariotas superiores como em leveduras. Esta molécula e/ou os seus derivados estão envolvidos numa série de processos variados como reparação de DNA, apoptose, imunidade antiviral (Pulloor 2014), exocitose e sinalização de insulina (Larner 2002), concentração de cálcio intracelular (Gerasimenko 2006), manutenção do potencial de membrana (Kukuljan, 1997), catabolismo de triglicéridos (Rapiejko 1986), biossíntese de ácidos gordos e fosfolípidos (Gaspar 2006), regulação de biossíntese (Jesch 2005) e *uptake* extracelular de inositol (Miyashita 2003) e regulação de expressão génica (Shen 2003). Assim, a manutenção dos níveis intracelulares desta biomolécula é muito importante para a homeostase celular. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode obter inositol de duas formas distintas: por biossíntese endógena e por *uptake* exógeno. No caso da biossíntese endógena, o inositol é obtido a partir de precursores glícídicos, nomeadamente o 6-fosfato de glucose (Figura 1) (Lai 1994).

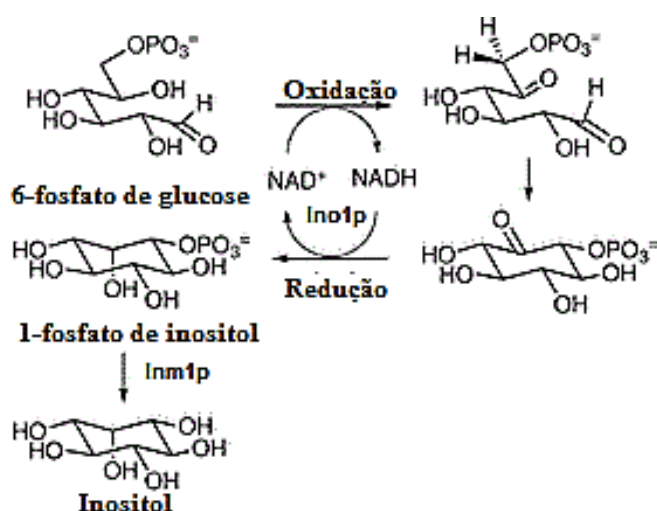


Figura 1 – Biossíntese de inositol a partir de 6-fosfato de glucose. O 6-fosfato de glucose, através do 1-fosfato de inositol sintase (Ino1p), é transformado em 1-fosfato de inositol, que por sua vez é desfosforilado a inositol pelo inositol monofosfatase (Inm1p). Adaptado de (Flatt 2007).

A reacção é catalisada pelo enzima 1-fosfato de inositol sintase (Ino1p), que é codificado pelo gene *INO1* e regulado pela presença de inositol (Lai 1994). O Ino1p converte o 6-fosfato de glucose em 1-fosfato de inositol, sendo este posteriormente convertido a inositol por desforforilação através do enzima inositol monofosfatase (Inm1p), codificado pelo gene *INM1*. No caso do inositol ser obtido pelo seu *uptake* exógeno, isto acontece através da utilização dos seus dois transportadores de inositol, a Itr1p e a Itr2p, tal como indicado na Figura 2 (Lai 1994).

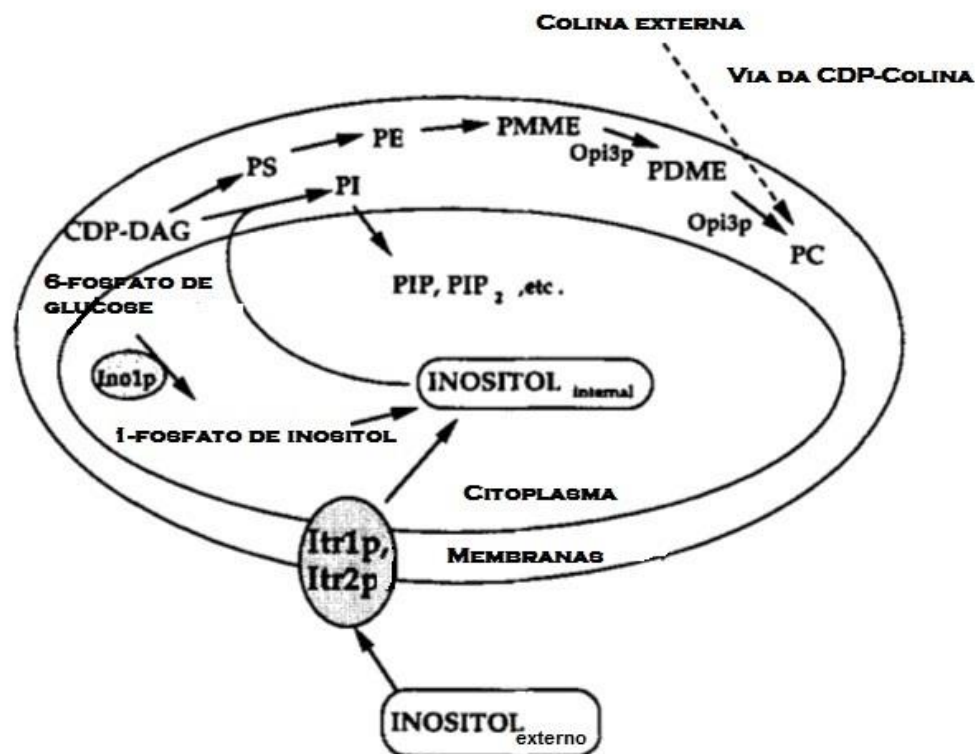


Figura 2 – Biossíntese de fosfolípidos e processos de obtenção de inositol: biossíntese e *uptake* extracelular. CDP-DAG, difosfato de citidina diacilglicerol, Ino1p, 1-fosfato de inositol sintase, PI, fosfatidilinositol, PIP, fosfato de fosfatidilinositol, PIP₂, bifosfato de fosfatidilinositol, PS, fosfatidilserina, PE, fosfatidiletanolamina, PMME, fosfatidilmonometiletanolamina, PDME, fosfatidildimetiletanolamina, PC, fosfatidilcolina, Itr1p e Itr2p, transportadores de inositol. Adaptado de (Lai 1994).

I.1 Os transportadores de inositol de *Saccharomyces cerevisiae* (Itr1p e Itr2p)

I.1.1. Estrutura e função dos transportadores de inositol Itr1p e Itr2p

Os transportadores de inositol de *S. cerevisiae*, Itr1p e Itr2p, são permeases pertencentes à superfamília dos facilitadores de transporte (*major facilitator superfamily*) (Nikawa 1991) e encontram-se ambos localizados na membrana plasmática desta levedura (Nikawa 1991). Os Itr1p e a Itr2p são codificados pelos genes *ITR1* (cromossoma IV (Jacq 1997)) e *ITR2* (cromossoma XV (Dujon 1997)) e contêm 584 e 609 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Figura 3) (Nikawa 1991). A comparação das respectivas sequências indica que há cerca de 85,6% de homologia entre as sequências das duas proteínas (Miyashita 2003). A Itr1p contém seis resíduos de aminoácido passíveis de serem modificados pós-traducionalmente: fosforilação no Thr12, Ser26, Ser31, Ser35, Ser37 e Ser46 (Holt 2009) e possui na sua sequência nove resíduos de cisteína (Miyashita 2003). Já a Itr2p possui oito resíduos de cisteína que se localizam em posições semelhantes aos resíduos correspondentes na Itr1p (Miyashita 2003). A nona cisteína da proteína Itr1p, ausente na Itr2p, corresponde ao resíduo de cisteína Cys262. A partir de estudos de mutagénese dirigida efectuados por Miyashita e colaboradores (2003), em que foram mutados os oito resíduos de cisteínas comuns às duas proteínas transportadoras de inositol para resíduos de serina, foi observado que nenhum destes resíduos é essencial para a actividade da Itr1p (Miyashita 2003). No entanto, nada se sabe da essencialidade ao transporte de inositol do resíduo de cisteína Cys262, que se encontra numa região transmembranar da Itr1p.

A estrutura tridimensional da proteína ainda não foi estudada, pelo que não se sabe se existem ligações persulfureto entre os resíduos de cisteína e de que forma uma alteração (ex. oxidação/redução) nestes resíduos afecta o comportamento da proteína, nomeadamente no transporte do inositol. Sabe-se ainda que estas duas proteínas são a única forma de transporte de inositol extracelular em leveduras *S. cerevisiae*, pois o transporte de inositol é completamente anulado em estirpes mutadas simultaneamente

nos genes *ITR1* e *ITR2* (Nikawa 1991). Apesar das duas proteínas apresentarem uma grande homologia na sua sequência de aminoácidos (Figura 3) (Miyashita 2003), a Itr1p apresenta uma actividade de transporte do inositol muito maior do que a Itr2p, resultado da sua maior afinidade para o inositol (Miyashita 2003). Na verdade, a proteína Itr1p é o transportador principal de inositol e a Itr2p o transportador minoritário (Nikawa 1991).

Itr1p	1	-----MGIHIPYLTSK-----TSQSNV-GDAVGNADSVFNFSEHDS	57
Itr2p	1	MKNSTAASSRWTKSRLSHFFPSYTNSSGMAASTDQSSDQGEELHHRKHCEEDNDGQKPKKSPVSTSTMQIKSRQDEDED	80
Itr1p	58	EDRIQIKPVNDEDDTSVMITFNQSLSPFIITLTFVASISGFMFGYDTGYISSALISIGTDLDHKVLTGYEKEIVTAATSL	137
Itr2p	81	DGRIVIKPVNDEDDTSVIITFNQSLSPFIITLTFVASISGFMFGYDTGYISSALISINRDLNKLVTGYEKEKELITAATSL	160
Itr1p	138	GALITSIFAGTAADIFGRKRCLMGSNLMFVIGAILQVSAHTFNQMAVGRLIMFGVGIGSLIAPLFISEIAPKMIRGRLT	217
Itr2p	161	GALITSVGAGTAADVFGRRPCLMFSNLMFLIGAILQITAHKFNQMAAGRLIMFGVGIGSLISPLFISEIAPKMIRGRLT	240
Itr1p	218	VINSLWLTTGGQLVAYGCGAGLNYVNWGRILVGLSLIPTAVQFTCLCLPDPTRYVVMKGDARATEVLKRSYTDTSSEEI	297
Itr2p	241	VINSLWLTTGGQLIAYGCGAGLNHVKNWGRILVGLSLIPTVLQFSFFCFLPDPTRYVVMKGDARATEVLKRSYVNTDEDEI	320
Itr1p	298	IERKVEELVTLNQSIQKGNVPEKVMNTIKELHTVPSNLRALIIGCGLQAIQQFTGWNSLMYFSGTIFETVGFKNSSAVSI	377
Itr2p	321	IDQKVEELSSLNQSIQKGNPITKFWNMVKELHTVPSNFRALIIGCGLQAIQQFTGWNSLMYFSGTIFETVGFKNSSAVSI	400
Itr1p	378	IVSGTNFIPTLVAFSSIDKIGRRITILLIGLPGMTMALVVCIAFHFLGIKFDGAVAVVSSGFSWGIIVFIIVFAAF	457
Itr2p	401	IVSGTNFVFTLIAFFCIDKIGRRYILLIGLPGMTVALVICAIAFHFLGIKFDGAVAVVSSGFSWGIIVFIIVFAAF	480
Itr1p	458	YALGIGTVPNQQSELPQNVRGIGTSYATATNWAGSLVIASTFLTMLQNITPAGTFAFFAGLSCLSTIFCYFCYPELSGL	537
Itr2p	481	YALGIGTVPNQQSELPQNVRGVGTSYATATNWAGSLVIASTFLTMLQNITPTGTFSFFAGVACLSTIFCYFCYPELSGL	560
Itr1p	538	ELEEVQTILKDGFNIAKASKALAKKRKQQVARV---HELYEPTQEIIEDI	584
Itr2p	561	ELEEVQTILKDGFNIAKASKALAKKRKQQVAEGAAHKLKFEPTQEIVES-	609

Figura 3 – Sequência de resíduos de aminoácidos das proteínas Itr1p e Itr2p de *S. cerevisiae*. Comparação entre sequências de resíduos de aminoácidos dos transportadores de inositol de *S. cerevisiae* Itr1p e Itr2p. As sequências representadas apresentam um alto nível de homologia (cerca de 85,6% (Miyashita 2003)) A vermelho encontram-se os resíduos de aminoácido homólogos em cada proteína. Imagem obtida através da utilização da ferramenta *Cobalt Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool* do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Apesar dos transportadores de inositol de *S. cerevisiae* apresentarem uma grande percentagem de homologia entre si, o mesmo não acontece quando comparados a transportadores de inositol homólogos de outras espécies. No caso da comparação das sequências de transportadores de inositol de *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* e *Homo sapiens*, utilizando a ferramenta *Clustal Omega*, a homologia da Itr1p com o correspondente transportador de inositol da espécie comparada não ultrapassa os 54% (Quadro 1 e Figura 4). Também utilizando a mesma ferramenta, construiu-se uma árvore filogenética dos transportadores de inositol que apresentam maior homologia na sequência entre as várias espécies em análise e as sequências da *S. cerevisiae*. A partir dos resultados apresentados na Figura 5 podemos observar que existe um ancestral comum a todas as espécies, havendo uma divergência evolutiva que levou à distanciação das sequências dos transportadores.

Quadro 1 – Percentagens de homologia entre transportadores de inositol de várias espécies. 1 – *Saccharomyces cerevisiae* Itr1p; 2 – *Saccharomyces cerevisiae* Itr2p; 3 – *Schizosaccharomyces pombe* Myo-inositol transporter 1; 4 – *Candida albicans* Potential myo-inositol transporter; 5 – *Homo sapiens* proton myo-inositol transporter. Obtido a partir da ferramenta *Clustal Omega* do site <http://www.ebi.ac.uk>.

%	1	2	3	4	5
1	100,00	86,81	45,96	53,28	29,62
2	86,81	100,00	42,45	51,72	31,56
3	45,96	42,45	100,00	43,80	34,73
4	53,28	51,72	43,80	100,00	32,20
5	29,62	31,56	34,73	32,20	100,00

Species	Protein	Sequence	Position
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	MKNSTAASSRWTKSRLSHFFPSYTNSSGMAASTDQSSTGEEELHHRKHCEDNDGQKPK	0
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	-----MSISSKDFQNVTSAGFAADTF--AADTFAADK	60
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	-----MGSSNTNTQSKATPSV-----LENEV-NSS	30
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	-----MGERRRKQPE-----	24
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	-----IQIKPVNDEDDTSVMITFNQSLSP	10
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	KSPVSTSTMQIKSRQD-----EEDDGRIVIKPVNDEDDTSVITFNQSSISP	24
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	KSPFESSVFENKTVQLPVDSV-SRLSNGARSRSNSISLSE----PHALNDTVEDQPVSK	107
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	KSSVSSSTSSAKGLLR-----ETTNGHMTSETSV-----QISESESRPSK	85
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	--PDAASAAGECSLLAAAESSTLSLQSAAGGGG-----VGDLERAARRQFQODETPA	64
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	-----	60
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	FIITLTFVASISGFMFGYDTGYISSALISIGTDLHKVLTGYEKEIVTAATSLGALITSI	84
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	FIITLTFVASISGFMFGYDTGYISSALISINRDLNKKVLTGYEKEIVTAATSLGALITSV	167
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	WVWLFAAAGIGGLFGYDTGVISGALVIGTSLGGHETNGGKEFITTSATSLGALLGGI	145
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	MVLVLTLASSISGFMFGYDTGYISSALVQIGTDLNKKILTSGEKEFITTSATSLGALLGAV	124
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	FVYVAVFSAAGGLFGYDTGVVSGAMLLKRLQLSLDALW---QELLVSSSTVGAAAVASL	117
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	FAGTAADIFGRKRLMGSLNMFVIGAILQVSAHTFWQMAVGRILMGFGVIGSLIAPLFI	144
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	GAGTAADVFGRRPCLMFNLMFLIGAILQITAHKFWQMAAGRLIMFGVIGSLISPLFI	227
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	IAGALADFFGRKPVIAIASIIIVGSIQVTAHLWHMIIIVGRFVIGWGVGASLIPLYL	205
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	VGGVLANLIGRRRVLGNSIIFVVGTTIQLAARTVWMTIAGRFLGWGVGASLTAPLMI	184
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	AGGALNGVFGRRRAILLASALFTAGSAVLAANMKETLLAGRLVVLGIGIASMTVPVYI	177
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	SEIAPKMIIRGLTVINSWLTTGGQLVAYGCGAGLNYV-NNGWRILVGLSLIPTAVQFCL	203
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	SEIAPKMIIRGLTVINSWLTTGGQLIAYGCGAGLNMV-KNGWRILVGLSLIPTVLQFSFF	286
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	SEIAPSKIRGLVYIIVLLITAGQVIAYGIDTAFEHV-HNGWRIMVGLAMVPAAFQFIL	264
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	SELAPAKYRGLTVTNWIFITGGQLIAYFINNGLTRV-SHGWRVSVGLCMVPPVLQFVLF	243
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	AEVSPPNLRGLVTINTLFTTGGQFFASVVDGAFSYLQKDGWRMYLGLAXVPAVQFFGF	237
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	CFLPDTPRYYVMKGDLARATEVLKRSYDTTSEE-IIERKVEELVLTNQSIPGKNVPEKVV	262
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	CFLPDTPRYYVMKGDLKRAKMWLKRYSVNTDEE-IDQKVEELSSLNQISIPGKNPITKVV	345
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	IWLPEPRILLVKKERSQEAYNTLARIYPTAHY-EIKTKLYLTQEGVRDPFGSGRQKIV	323
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	WFLPDTPRFYVMNGNFEKARQVLKRVHVDPSDE-FVNATIDEMIASDSTVPNGPLQKAW	302
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	LFLPESPRWLQKQGTQKARRILSQMRNGQTIIDEYDSIKNWEIEEEEKEVGSAG-----	291
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	NTIKELHTVPSNLRALIIGCGLQAIQQTGMNSLMYFSGTIFETVGFKNSSAV---SIIIV	319
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	NMVKELHTVPSNFRALIIGCGLQAIQQTGMNSLMYFSGTIFETVGFKNSSAV---SIIIV	402
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	KTFKELYFNPFRALILACGLQAMQQLSGFNSLMYFSSTIFEVVGFNMPTAT---GLII	380
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	KSIIKIHTTGPFRALILACGLQGTQQTGFNSLMYFSATIFETIGFHNATAV---SIII	359
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	PVICRMLSYPPTRRALIVGCGLQMFQQLSGINTIMYYSATILQMSGVEDDRLAINLASVT	351
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	SGTNFIFTLVAFFSIDIKIGRRITILLGLPGMTMALVVCISIAFHFLG-----IKFD	369
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	SGTNFIFTLIAFFCIDIKIGRRITILLGLPGMTVALVCAIAFHFLG-----IKFN	452
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	AATNFVFTIVAFGVIDFGRRITLLLTWGMIAAILICAVAFHFLP-----KDEN	430
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	AATNFVFTGIAICIIDKVGRRRILLVGMPCMCISILVCAVAFHYLN-----VDFS	409
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	AFTNFIFTLVGWLVEKVGRRILTFGLAGTTVALIILALGFVLSAQVSPRITFKPIAPS	411
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	GAVAV-----VWSSGFSSW-----	383
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	GADAV-----VASDGFSSW-----	466
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	GN-----VTSQGSNAW-----	441
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	TG-T-----VVSRIINGW-----	421
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	GQATCTRYSYCNCEMLDPDCGFCXKMNKSTVIDSSCPVKNKASTNEAAWGRCENETKFK	471
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	-----GIVIIVFIIVFAAFYALGIGTVPWQQ-SELF-QNVRGIGTSYAT	426
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	-----GIVIIVFIIVYAAFYALGIGTVPWQQ-SELF-QNVRGVGTSYAT	509
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	-----AIVVLISMIVVYASYASGLNLPWQQ-SELF-MSVRGLGTGMST	484
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	-----GIVIIIGMILYVASYAIGNAAMVG-VELFSDVNVRSIGAMYAK	465
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	TEDIFWAYNFCPTPYSWTALLGLILYLVFAPGMMPMTVNSEIYP-LWARSTGNACSS	530
Saccharomyces cerevisiae	Itr1p	ATNWAGSLVIASFTLMLQNITPTGTFFSFFAGVACLSTIFCYFCYPELSGLELEEVQITL	486
Saccharomyces cerevisiae	Itr2p	ATNWAGSLVIASFTLMLQNITPTGTFFSFFAGVACLSTIFCYFCYPELSGLELEEVQITL	569
Schizosaccharomyces pombe	Myo-inositol_transporter_1	AVNWAGSLGIGASFTLMLSEITPTGTFFALYGGLCFLGWLGAFCYDPLTDYITIEIGELL	544
Candida albicans	Potential_myo-inositol_transporter	CTNWAGSLVIASFTLMLENITPTGTFFSFFAGLCFAIFFVYVFLPDTAGLELEETDFFL	525
Homo sapiens	proton_myo-inositol_transporter	GINWIFNMVL-----	540
Saccharomyces cerevisiae</			

Figura 4 – Alinhamento múltiplo de sequências de transportadores de inositol de várias espécies. Código de cores de propriedades de resíduos de aminoácidos: **Vermelho** – resíduos com pequenas cadeias laterais ou aromáticos ; **Azul** – resíduos com propriedades ácidas; **Rosa** – resíduos com propriedades básicas; **Verde** – resíduos com grupos hidroxilo, sulfidril e amina; **Cinzentos** – resíduos de amino/iminoácidos incomuns. Código de símbolos *consensus*: (*) - resíduo totalmente conservado; (:) - resíduo conservado entre grupos de propriedades fortemente semelhantes tendo um *score* > 0,5 na matriz Gonnet PAM 250; (.) - resíduo conservado entre grupos de propriedades fracamente semelhantes tendo um *score* = < 0,5 na matriz Gonnet PAM 250. Obtido a partir da ferramenta *Clustal Omega* do site <http://www.ebi.ac.uk>.

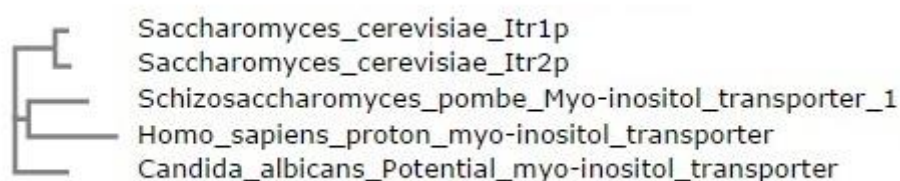


Figura 5 – Árvore filogenética dos transportadores de inositol de *Saccharomyces cerevisiae* e dos transportadores de inositol homólogos de *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida Albicans* e *Homo sapiens*. Obtido a partir da ferramenta *Clustal Omega* do site <http://www.ebi.ac.uk>.

As sequências comparadas foram obtidas pela utilização da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) - *Standard Protein BLAST* do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> a partir da procura de sequências homólogas à da Itr1p nas várias espécies. Para a determinação das homologias foram escolhidas as sequências com o maior *score* de cada espécie analisada. A *Schizosaccharomyces pombe* possui dois genes de transportadores de inositol, tal como a *S. cerevisiae*, também chamados de *ITR1* e *ITR2*. Como o genoma de *Candida albicans* ainda não está bem estudado, apenas se conhecem genes potenciais codificantes de transportadores de inositol nesta espécie, que são o *HGT19* (*ITR1*) e o *HGT15* (*ITR2*). Em humanos (*Homo sapiens*) conhecem-se três transportadores de inositol, sendo dois deles cotransportadores de sódio-inositol (*SLC5A3* e *SLC5A11*) e um cotransportador de H⁺-inositol (*SLC2A13*).

I.1.2. Regulação da expressão dos genes *ITR1* e *ITR2* a nível transcricional

Na levedura *S. cerevisiae* a biossíntese de fosfolípidos dá-se de um modo coordenado com a síntese de outras classes de lípidos (Carman 2009). Alguns dos genes envolvidos na síntese destas moléculas contêm nas suas regiões promotoras o elemento UAS_{INO} , que é regulado pelos factores de transcrição Ino2p, Ino4p e Opi1p, codificados pelos genes *INO2*, *INO4* e *OPI1*, respectivamente (Carman 2005). Sabe-se que quando é adicionado inositol ao meio de crescimento das células existe uma mudança nos padrões lipídicos celulares, ocorrendo uma reprogramação da síntese e *turnover* dos lípidos celulares (Gaspar 2006). O inositol pode funcionar como agente activador ou como agente repressor da expressão de genes que contenham o elemento UAS_{INO} . A adição de inositol induz a expressão de um pequeno conjunto de genes (*OPI1*, *DPPI1*, *AUR1*, *INM1*) e a repressão de um conjunto mais alargado de genes (*INO1*, *ITR1*, *PSSI/CHO1*, *CDS1*, *PSD1*, *CHO2/PEM2*, *CK11*, *CPT1*, *FAS1*, *PGS1*, *ACCI*) (Gaspar 2006; Jesch 2005). Tal como podemos observar, o gene *ITR1* é um dos que tem a sua expressão regulada pelo inositol. A expressão sincronizada destes genes (que ocorre na ausência de inositol) requer a participação dos factores Ino2p e Ino4p, que se ligam como heterodímeros à sequência UAS_{INO} (Jesch 2005) (Figura 6).

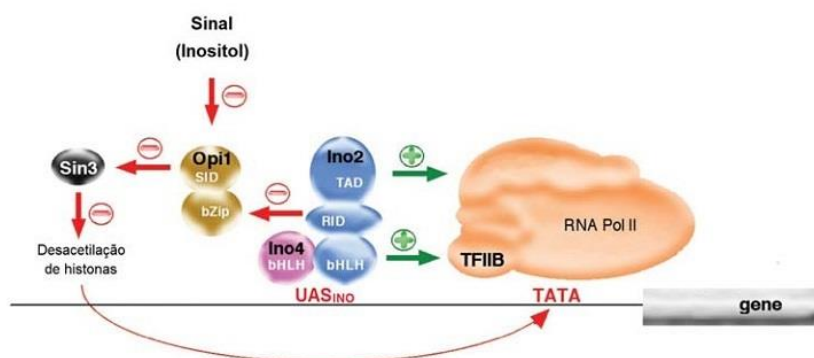


Figura 6 – Regulação do elemento UAS_{INO} . A verde encontram-se as interações de activação. A vermelho encontram-se as interações de repressão. Sin3p – *hystone deacetylase complex*; Ino2p e Ino4p – factores de transcrição; SID – domínio de interacção com Sin3p; TAD – domínio de activação da transcrição; RID – domínio de interacção repressor; bZip – *basic leucine zipper*; bHLH – *basic helix-loop-helix*; RNA Pol II – RNA polimerase II; TFIIB – factor de transcrição IIB; TATA – *TATA box*; UAS_{INO} – *inositol-sensitive upstream activating sequence*. Adaptado de (Schweizer 2004).

Quando os níveis de inositol celulares aumentam, o complexo Ino2p-Ino4p interage com a proteína repressora Opi1p. A Opi1p, por sua vez, interage com a Sin3p (*hystone deacetylase complex*), um desacetilase de histonas que provoca alterações na estrutura do DNA reprimindo a transcrição (Figura 6) (Jesch 2005).

O regulador negativo Opi1p, necessário à repressão dos genes que contêm as sequências UAS_{INO}, foi localizado no retículo endoplasmático (RE) como parte de um complexo do qual também faz parte a proteína Scs2p (*membrane-spanning protein*) e o ácido fosfatídico (PA). A Opi1p interage com a Scs2p através de um domínio denominado FFAT; no caso do PA, este composto acumula-se no retículo endoplasmático (RE) como intermediário da biossíntese de fosfolípidos na ausência de inositol. Estas ligações são ambas necessárias para que a Opi1p se mantenha no RE (Loewen 2003; Gaspar 2006) (Figura 7A). Quando é adicionado inositol ao meio, os níveis de PA diminuem devido ao aumento da síntese de fosfatidilinositol (PI) (Gaspar 2006). Esta diminuição do PA é sentida pela Opi1p (Jesch 2005) resultando na sua libertação do RE e translocação para o núcleo, onde irá ter a sua acção repressora nos genes que apresentam o elemento UAS_{INO} na sua região promotora (Gaspar 2006; Jesch 2005) (Figura 7B). Esta translocação foi observada por microscopia de fluorescência, recorrendo a uma estirpe *pil1Δ* transformada com um plasmídeo que possui a região codificante Opi1-GFPp (Loewen 2004).

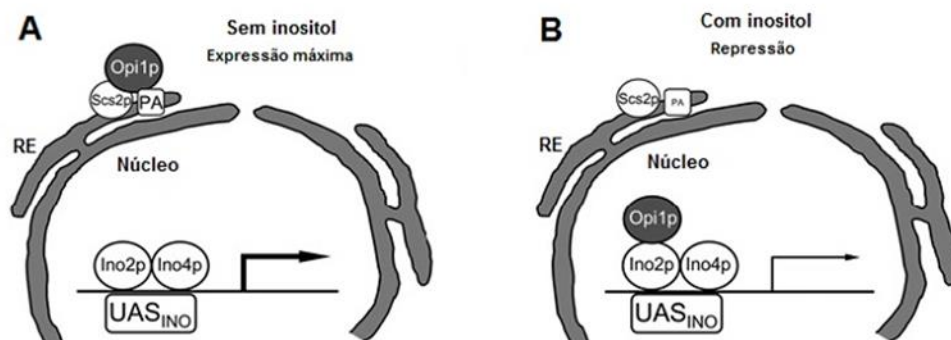


Figura 7 – Regulação da translocação nuclear de Opi1p pela presença de inositol.

A – Quando o inositol está ausente, a proteína Opi1p localiza-se no RE, associada à proteína Scs2p e ao PA, permitindo a expressão dos genes que possuem a sequência UAS_{INO} na região promotora. **B** – Quando o inositol está presente, os níveis de PA baixam no RE, o complexo Scs2p-Opi1p-PA é dissociado e a proteína Opi1p é translocada para o núcleo das células, ligando-se ao heterodímero Ino2p-Ino4p nas sequências UAS_{INO}, sendo a expressão dos genes reprimida. Scs2p – *membrane-spanning protein*; PA – ácido fosfatídico; RE – retículo endoplasmático; Ino2p e Ino4p – factores de transcrição; UAS_{INO} – *inositol-sensitive upstream activating sequence*. Adaptado de (Carman 2005).

Uma vez que o inositol está envolvido na regulação de diversos processos celulares, nomeadamente na regulação da expressão de uma série de genes (Gaspar 2006, Jesch 2005), o seu conteúdo celular deve ser estritamente regulado. O gene *ITR1*, quando não existe inositol no meio de crescimento, está sujeita a uma regulação através das proteínas Ino2p/Ino4p, ou seja, a expressão do gene *ITR1* é activada, dado que este gene contém o elemento UAS_{INO} (Lai 1994). Consequentemente o ITR1 também é regulado pelo factor de transcrição Opi1p (Lai 1994).

Como já foi referido, o inositol está envolvido na regulação do gene que codifica um transportador de inositol de *S. cerevisiae*, o gene *ITR1*. A regulação deste gene é realizada de maneira diferente da regulação do gene *ITR2*. Enquanto que o gene *ITR1* é regulado negativamente pela presença de inositol e colina no meio exterior, a expressão do *ITR2* é constitutiva (Nikawa 1993). Foi observado, a partir da análise de *microarrays* de RNA preparados a partir de culturas de *S. cerevisiae* com o gene *GLN3* (envolvido no metabolismo de glutamina) e o gene *YAPI* (factor de transcrição necessário à resposta ao *stress* oxidativo) deletados, que havia uma alteração da expressão do *ITR1*, o que indica que estes factores de transcrição poderão interferir na expressão do gene *ITR1* (Hu 2007, Cohen 2002). Já no caso do gene *ITR2*, os dados obtidos a partir da análise de *microarrays* de RNA, existe uma alteração da expressão pela deleção do gene *IXR1*, que é um repressor transcricional de genes de hipóxia durante normóxia (Vizoso-Vazquez 2012).

III.1.3. Regulação do conteúdo de Itr1p

Além da regulação transcricional, a expressão do gene *ITR1* é ainda regulada a nível da degradação da Itr1p (Robinson 1996). O transporte de inositol pela proteína Itr1p, na presença de excesso de inositol exógeno é reprimido, sendo que existe um sinal de marcação para degradação desta proteína no vacúolo. Assim o *turnover* da Itr1p é rápido sendo os seus níveis mantidos ao ser equalizada a taxa de degradação com a de síntese (Lai 1995). Quando não existe inositol exógeno, a degradação diminui e a proteína torna-se estável na membrana plasmática durante pelo menos duas horas (Lai 1995).

A degradação da Itr1p é realizada após a sua internalização. Para isso é necessário haver a marcação da Itr1p com ubiquitina (Hitchcock 2003) com a subsequente internalização e degradação no vacúolo (Nikko 2009). No caso das leveduras, a E3 ubiquitina-proteína ligase (Rsp5p) e os adaptadores de tráfego relacionados com arrestinas (do inglês *arrestin-related trafficking adaptors*, ARTs) são recrutados para a membrana plasmática, em resposta a estímulos ambientais que activem a endocitose de permeases e transportadores (Polo 2008). Através do seu motivo PY, uma sequência geralmente caracterizada por dois resíduos de prolina adjacentes seguidos por um resíduo de aminoácido qualquer e finalmente uma tirosina (PPXY) (Belgareh-Touze 2008), as ARTs ligam-se à Rsp5p e medeiam a ubiquitinação da proteína alvo. A proteína ubiquitinada é então internalizada e degradada. Durante este processo as ARTs são também ubiquitinadas, um evento necessário ao processo de endocitose (Figura 8) (Polo 2008).

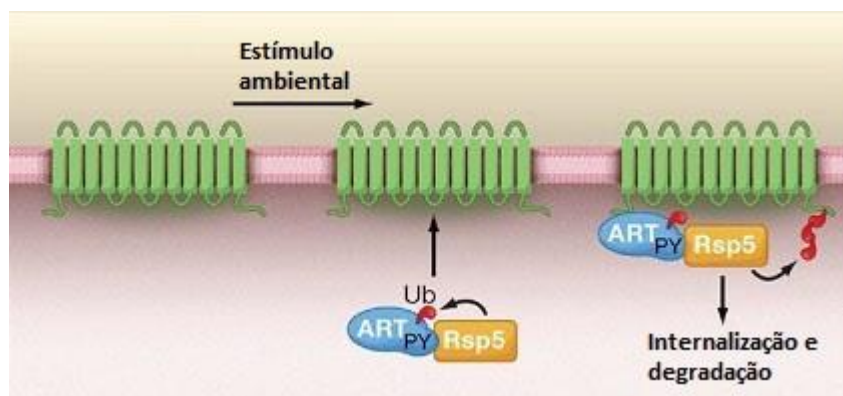


Figura 8 – Mecanismo de acção de arrestinas em leveduras. Em leveduras, as arrestinas são reconhecidas pela Rsp5p através do motivo PY, o que desencadeia o processo de ubiquitinação da proteína, internalização e degradação. ART – arrestina; Rsp5p - E3 ubiquitina-proteína ligase; Ub – ubiquitina; PY – motivo de ligação à Rsp5p. Adaptado de (Polo 2008)

No caso da Itr1p, o processo de ubiquitinação é realizado pela Rsp5p, que requer a presença de uma proteína adaptadora para ser reconhecida e se dar o processo de ubiquitinação. Esta proteína, no caso da degradação da Itr1p, é a arrestina 5 (Art5p),

uma proteína que contém o motivo PY que é reconhecido pela Rsp5p e se liga à Itr1p, tornando assim possível que esta seja marcada para degradação (Nikko 2009). Foi observado por Nikko e colaboradores (2009) que a deleção do gene que codifica a proteína Rsp5p impede a internalização da Itr1-GFPp e que apenas com a adição de um plasmídeo contendo a sequência codificante da proteína Rsp5p se retomava a internalização da Itr1-GFPp. Também foi observado, pela utilização de oito estirpes mutadas em cada um dos genes que codificam a arrestina (excluindo a Art5p), que a internalização da Itr1-GFPp não era afectada. Assim podemos afirmar que a Rsp5p é essencial ao processo de internalização da Itr1-GFPp e que, das arrestinas existentes, apenas a Art5p é necessária ao processo de internalização da Itr1-GFPp (Nikko 2009).

O processo pelo qual a Art5p é activada ainda não é conhecido. No entanto foi observado que na arrestina 4 (Art4p), uma proteína muito semelhante à Art5p, o processo de internalização do transportador é desencadeado pela fosforilação/desfosforilação desta proteína (Pereira 2014). Sendo que ambas as proteínas são muito semelhantes e partilham a mesma função, a Art5p poderá eventualmente ser activada por um mecanismo semelhante.

I.2. Modelo biológico da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes ao filo *Ascomycete*. Têm vindo a ser reconhecidas com um modelo bastante importante, representando um eucariota simples cujo genoma é facilmente manipulável (Sherman 2002). Embora a sua complexidade genética seja superior à de organismos procariotas, são partilhadas algumas características importantes que tornam a sua utilização vantajosa em estudos biológicos em detrimento de outros tipos de modelo: (i) crescimento simples e rápido, (ii) facilidade de isolamento de mutantes e células transformantes, (iii) sistema genético bem definido (genoma totalmente sequenciado), (iv) sistema de transformação de DNA altamente versátil. Para além destas características possuem ainda a vantagem de não serem patogénicas e a sua manutenção requerer baixos custos (Sherman 2002).

Por outro lado, a *S. cerevisiae* partilha também algumas características com as bacterianas, tornando-a ainda mais relevante como modelo biológico: cresce rapidamente em qualquer tipo de meio nutritivo, líquido ou sólido, desde que haja disponibilidade de nutrientes, conseguindo duplicar a sua população em menos de duas horas. Pode ser manipulada fisiologicamente, mediante manipulação do meio de cultura (Jamieson 1998). Possui uma multiplicidade de marcadores de selecção, incluindo marcados de selecção nutricional (ex. *HIS3*, *URA3*), resistência a fármacos (ex. *kanMX*, *patMX*, *natMX*) e susceptibilidade a fármacos (ex. *cyhR*) (Auerbach 2005). Este microorganismo adequa-se a estudos de *stress* oxidativo uma vez que consegue alterar o grau de utilização de respiração, consoante o tipo de fonte de carbono disponível (Gralla 1997).

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro eucariota cujo genoma foi totalmente sequenciado (Goffeau 1996). O seu genoma é pequeno, contendo numa célula haplóide cerca de 6000 genes em 16 cromossomas (Hudson 1997). Esta estirpe reproduz-se quer por gemulação (reprodução assexuada) quer por conjugação (reprodução sexuada). A viabilidade dos estados haplóide e diplóide possibilita diversas aplicações genéticas, nomeadamente a obtenção de estirpes com mais do que um gene mutado ou o estudo de mutações em genes recessivos, situação que em outros organismos mais complexos seria mais complicada (Sherman 2002). A *S. cerevisiae* partilha a mesma organização celular que as células eucariotas mais evoluídas (núcleo, mitocôndrios, complexo de Golgi) e variados enzimas, vias metabólicas e genes reguladores (Gralla 1997). Por todas as características referidas a *S. cerevisiae* tornou-se um dos organismos chave em investigação genética (Sherman 2002).

A versatilidade experimental aliada à notável conservação da função génica ao longo da evolução, faz da levedura *S. cerevisiae* um modelo biológico amplamente requisitado, consistindo num ponto de partida para estudos de fenómenos biológicos (ex. *stress* oxidativo) e processos celulares (ex. vias de sinalização celular) em eucariotas, podendo ser os conhecimentos adquiridos posteriormente aplicados a eucariotas superiores. Como modelo de processos celulares fundamentais e vias metabólicas em humanos, melhorou o conhecimento e facilitou a análise molecular de vários genes associados a doenças (Snyder 2002). O aparecimento de várias patologias com origem em processos oxidativos aumentou o interesse no estudo da sua origem e desenvolvimento, nomeadamente doenças neurodegenerativas e doenças oncológicas.

Porém, o estudo destes processos em células animais é bastante demorado e complexo, pelo que a levedura é um bom modelo de partida para simular as condições encontradas em células animais (Cunha 2001).

I.3. O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o *stress* oxidativo

I.3.1. O H₂O₂ como indutor de *stress* oxidativo

A grande maioria dos organismos sobrevive à custa de um ambiente aeróbio. O aparecimento de oxigénio na atmosfera durante o processo evolutivo inicial tornou possível o metabolismo respiratório e o desenvolvimento de sistemas de geração de energia eficientes (Temple 2005), mas conduziu também a uma variedade de processos de *stress* celular derivados da natureza reactiva do oxigénio molecular (O₂), levando à produção de moléculas e de radicais livres resultantes do seu metabolismo. Estes produtos, designados geralmente por espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), incluem um grande leque de moléculas que podem ser tidas como oxidantes (como o peróxido de hidrogénio, H₂O₂) ou redutoras (como o radical anião superóxido O₂^{•-}) e todas têm a capacidade de afectar a homeostase redox da célula (Perrone 2008). São espécies químicas reactivas podendo conduzir a variados efeitos nocivos, tendo a capacidade de lesar constituintes celulares como DNA, lípidos e proteínas (Jamieson 1998, Perrone 2008, Temple 2005).

Os ROS são gerados endogenamente como consequência de processos metabólicos mas podem também ser formados por exposição das células a condições ambientais adversas, como aumento da pressão de oxigénio, choque térmico, exposição a radiação ionizante, metais pesados ou oxidantes químicos (Jamieson 1998, Moradas-Ferreira 1996). Os ROS podem também ser formadas em concentrações elevadas durante processos de resposta imune levadas a cabo por células especializadas do sistema imunitário, como por exemplo os fagócitos ou granulócitos, mais concretamente neutrófilos, através da acção do enzima NADPH oxidase – explosão respiratória (Barja 1993, Forman 2007, Suzuki 1997, Tsukimori 2005).

Em ambiente celular podem ser produzidos vários ROS, nomeadamente os vários radicais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo (HO^{\bullet}), radicais peróxido (ROO^{\bullet}), radicais alcóxido (RO^{\bullet}), mas também moléculas como o dioxigénio singuleto (1O_2), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), outros hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$) e ainda peroxinitrito ($ONOO^-$) (Cadenas 1998).

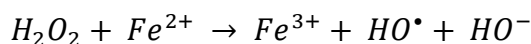
Devido à natureza ubíqua dos ROS, não é de estranhar que a maioria (senão todos) os organismos tenham desenvolvido mecanismos para protegerem os seus componentes celulares contra o *stress* oxidativo (Jamieson 1998). O *stress* oxidativo representa um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante da célula para destoxificar rapidamente os intermediários reactivos ou para reparar os danos celulares induzidos, a favor da produção de ROS (Jamieson 1998, Sies 1997). Sob condições fisiológicas normais, os mecanismos de defesa de antioxidantes são quase certamente adequados para manter os ROS em níveis basais, não lesivos, e para reparar os danos celulares infligidos. Aliás os ROS em níveis basais são necessários para processos de sinalização intracelular (ex. controlo de factores de crescimento) através da oxidação de resíduos de cisteínas reactivos encontrados em proteínas sensíveis ao estado de oxidação (Finkel 2011). As defesas primárias neutralizam os ROS (ex. superóxido dismutases (SOD), catalase), enquanto as secundárias reparam ou removem os produtos do dano oxidativo ao DNA, proteínas ou lípidos (ex. enzimas envolvidos em *base excision repair*) (Moradas-Ferreira 1996). Todos os organismos que sobrevivem à custa do metabolismo aeróbio são continuamente expostos a estes agentes, levando a uma situação de *stress* oxidativo.

O peróxido de oxigénio (H_2O_2) é o principal ROS formada endogenamente e o que apresenta maior estabilidade (Giorgio 2007), daí que tenha vindo a receber especial atenção por parte da comunidade científica devido a ser um forte oxidante e à sua presença ubíqua em todos os organismos aeróbios (Chance 1979). Os organismos estudados até ao momento demonstraram uma elevada sensibilidade a pequenas variações na concentração desta molécula, pelo que se torna óbvia a necessidade de possuírem mecanismos de eliminação desta espécie química e de anulação dos seus efeitos nefastos (Giorgio 2007). O H_2O_2 tem uma dualidade funcional, uma vez que surge associado a variadas reacções químicas de oxidação de tióis de inactivação de enzimas (Grant 2011) mas também à sinalização celular em diferentes processos

(desenvolvimento, proliferação, morte celular programada, transdução de sinal, entre outros) (de Oliveira-Marques 2009).

O H_2O_2 pode ser gerado endogenamente através de variadas reacções catalisadas enzimaticamente (Chance 1979). Uma das principais fontes endógenas de H_2O_2 é a reacção de dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), catalisada pelos SODs. No caso de leveduras os enzimas responsáveis são o superóxido dismutase de Cobre/Zinco (SOD_Cu/Zn, SOD1) e o superóxido dismutase de Manganês (SOD_Mn, SOD2) (Longo 1999). O H_2O_2 pode também ser gerado directamente devido à actividade enzimática de oxidases ou ainda durante o processo de β -oxidação de ácidos gordos (Cai 2005, Forman 2007, Temple 2005, Zhang 2006). Por outro lado o H_2O_2 pode igualmente ser produzido extracelularmente em concentrações elevadas durante o processo de resposta imunitária inata levada a cabo por fagócitos e granulócitos, através da dismutação do anião superóxido catalisada pelo enzima NADPH oxidase, actuando depois intracelularmente (Barja 1993, de Oliveira-Marques 2007, Forman 2007, Suzuki 1997, Tsukimori 2005).

À semelhança de outros ROS, quando em concentrações elevadas promove diversos tipos de danos celulares: (i) aumento do nível de oxidação de tióis de proteínas específicas; (ii) carbonilação de proteínas; (iii) peroxidação lipídica e danos no DNA (Costa 2002, Jamieson 1998, Le Moan 2006). Os danos induzidos pelo H_2O_2 podem ocorrer de forma indirecta, através da formação do radical hidroxilo (HO^{\bullet}), extremamente reactivo, que reage indiscriminadamente com a maioria dos constituintes celulares. A produção deste radical ocorre via reacção de Fenton (Equação 1) por reacção com iões de metais de transição reduzidos como o Fe^{2+} e o Cu^+ , que são oxidados durante o processo (Temple 2005, Toledano 2003).



Equação 1 – Reacção de Fenton

Em concentrações fisiológicas ($10^{-9} - 10^{-7}$ M), têm sido atribuídas várias funções importantes ao H_2O_2 ao nível da sinalização celular: (i) indução da fosforilação de

proteínas; (ii) indução dos níveis de Ca^{2+} , (iii) alteração do grau de oxidação de tióis em proteínas específicas; (iv) papel de segundo mensageiro como resposta a citocinas e factores de crescimento (Forman 2007, Le Moan 2006, Suzuki 1997, de Oliveira-Marques 2009).

I.3.2. O estado estacionário de H_2O_2 como indutor de *stress* oxidativo

No sentido de simular as condições existentes *in vivo* aquando a exposição das células ao H_2O_2 , nomeadamente em situações de *stress* oxidativo, têm sido feitas várias abordagens em diversos sistemas biológicos. Porém, a grande maioria delas baseia-se numa adição *bolus* de H_2O_2 , correspondente à concentração desejada, sendo o H_2O_2 consumido pelos peroxidases intracelulares, como é o caso do catalase, sem que haja qualquer fonte de produção do H_2O_2 no sentido de o repor, pelo que a sua concentração será decrescente ao longo do tempo que decorre a experiência (Antunes 2001, de Oliveira-Marques 2009). Esta situação não se assemelha à que ocorre *in vivo*, que é caracterizada por uma concentração constante de H_2O_2 ao longo do tempo. Quando se adiciona H_2O_2 em condições *bolus*, a concentração de H_2O_2 vai decrescendo ao longo do tempo (Figura 10B) pelo que há, frequentemente, uma necessidade de adicionar doses iniciais de H_2O_2 muito elevadas (na ordem dos $10^{-5} - 10^{-3}$ M), duas a cinco vezes superior à concentração de H_2O_2 encontrada *in vivo*. Estes níveis muito elevados de H_2O_2 representam um choque agudo não fisiológico, provocam modificações oxidativas severas (algumas das quais irreversíveis), disrompem a homeostase celular e induzem respostas celulares que podem não estar relacionadas com as induzidas pelas menores concentrações de H_2O_2 encontradas *in vivo*. Como tal, a adição de H_2O_2 em condições *bolus* não é um método adequado para estudar questões fundamentais sobre os efeitos biológicos do H_2O_2 a nível regulatório (Antunes 2001). Foi assim desenvolvida uma abordagem experimental que permite mimetizar a concentração constante de H_2O_2 encontrada *in vivo*, a adição de H_2O_2 em estado estacionário (Antunes 2001) (Figura 9B). O estado estacionário de H_2O_2 é obtido através da adição ao meio de cultura de uma fonte geradora de H_2O_2 , o enzima glucose oxidase (GO) (Equação 2) (Figura 9A), que compensa o consumo levado a cabo pelos peroxidases intracelulares (catalase e

glutathione peroxidases). O enzima glucose oxidase utiliza como substrato a glucose presente em excesso no meio de cultura (Antunes 2001).

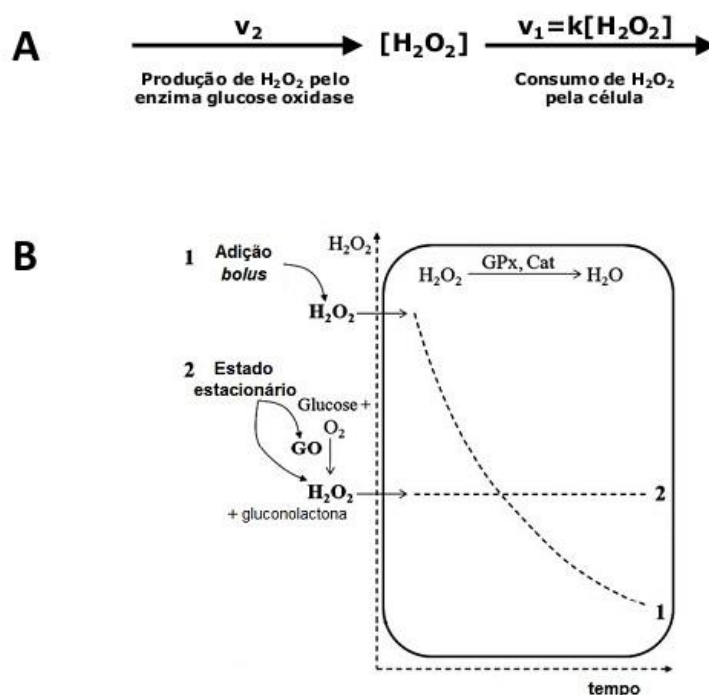
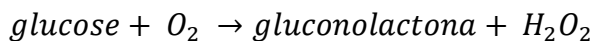


Figura 9 – A. Geração de um estado estacionário de H_2O_2 . O glucose oxidase produz H_2O_2 numa quantidade que compensa o seu consumo pelos enzimas intracelulares. **B. Comparação de métodos de entrega de H_2O_2 às células.** Através de adição bolus de concentração elevadas de H_2O_2 , este é consumido sem que haja a sua reposição. Através do método de estado estacionário a sua concentração é mantida contante desde a adição inicial. Cat, catalase; Gpx, glutathione peroxidase; GO, glucose oxidase. Adaptado de (de Oliveira-Marques 2009)



Equação 2 – Reacção de produção de H_2O_2 pelo enzima catalase

A adição de H_2O_2 em estado estacionário é vantajosa relativamente à adição em *bolus* porque: (i) mimetiza a produção endógena contínua de H_2O_2 *in vivo*, contrariamente à adição em *bolus* que disrompe a homeostase celular; (ii) uniformiza a entrega de H_2O_2 porque este é fornecido numa concentração de estado estacionário (concentração de H_2O_2 mantém-se constante); (iii) na adição em *bolus* a dose efectiva

de H_2O_2 entregue por célula é desconhecida porque depende tanto da densidade celular como do consumo de H_2O_2 pelo meio de crescimento, o que torna a comparação de dados entre laboratórios difícil; (iv) permite a distinção de respostas celulares de acordo com a concentração de H_2O_2 que as desencadeia, contrariamente à adição em *bolus*, onde as respostas celulares surgem todas associadas; (v) permite determinar a concentração de H_2O_2 ao longo do ensaio.

O modelo de estado estacionário consiste então numa melhor aproximação às condições fisiológicas, com a vantagem de não disromper a homeostase celular.

I.3.3. A adaptação ao H_2O_2 em *Saccharomyces cerevisiae*

Durante o processo de *stress* oxidativo é desencadeado uma série de mecanismos que permitem às células adaptarem-se às condições adversas com o intuito de sobreviverem. Foi observado que o peróxido de hidrogénio induz uma resposta adaptativa ao *stress* oxidativo em *S. cerevisiae* (Collinson 1992), em células previamente expostas a uma dose sub-letal do agente e submetidas posteriormente a uma dose letal do mesmo. A pré-exposição das células ao peróxido de hidrogénio desencadeia uma série de processos celulares e moleculares que conferem uma maior resistência às células quando confrontadas com doses letais deste agente (Branco 2004).

Os processos biológicos que estão na base da resposta adaptativa ao *stress* oxidativo têm vindo a ser amplamente estudados não só em *S. cerevisiae* mas também em outros organismos. Em *S. cerevisiae* os estudos são focados essencialmente nos mecanismos de remoção de ROS, nos danos causados e nos mecanismos de reparação dos mesmos.

A resposta celular ao H_2O_2 consiste numa diversidade de respostas de sinalização celular com activação de factores de transcrição e mecanismos de sinalização intracelulares responsáveis pela regulação da expressão de genes que codificam proteínas cujos níveis são alterados como resultado do *stress* oxidativo induzido pelo H_2O_2 (Hasan 2002, Toledano 2003, Pedroso 2009).

Um aspecto interessante da resposta adaptativa ao H_2O_2 é que a indução de diferentes padrões de alterações proteicas e de expressão génica em *S. cerevisiae* é também observada em outras situações de *stress* oxidativo. Muitas das proteínas cuja expressão génica se encontra alterada em resposta a H_2O_2 , vêem também a sua expressão alterada quando expostas a outros fenómenos indutores de *stress* oxidativo que não os provocados pelo H_2O_2 . Estas observações indiciam uma resposta comum entre fenómenos de *stress* (Godon 1998, Moradas-Ferreira 1996).

Recorrendo ao uso de *microchips* de DNA e a técnicas genómicas avançadas foi possível observar alterações nos níveis de mRNA durante a resposta adaptativa a H_2O_2 . Foram observadas alterações em cerca de um terço do genoma de *S. cerevisiae* sendo que, de entre o grande número de genes que viram a sua expressão alterada, aproximadamente 500 estão envolvidos em fenómenos de resposta a *stress* (Causton 2001, Gasch 2000). Destes são induzidos aqueles associados ao metabolismo glicídico, reposta ao *stress* celular e geração de energia (via glicólise). Os reprimidos estão ligados à tradução e síntese proteicas (Godon 1998). Foi observado que a resposta ao H_2O_2 caracteriza-se principalmente por uma forte indução de genes associados à destoxificação de ROS (superóxido dismutases, SOD e glutatono peroxidases, GPx) e de genes relacionados com reacções de oxidação-redução intracelulares. Porém estes resultados foram obtidos através de uma adição de uma dose *bolus* (letal) de H_2O_2 , que resulta em concentrações de H_2O_2 em nada semelhantes às observadas *in vivo*. Neste tipo de abordagem experimental a resposta observada envolve muito mais genes devido quer à própria resposta da célula ao *stress* oxidativo quer à enorme alteração do estado *redox* da célula, havendo uma junção de diferentes respostas que conduzem a resultados inespecíficos e, em muitos casos, inconclusivos. Entretanto foi estudada a resposta génica das células de *S. cerevisiae* adaptadas a 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário durante 90 min (Pedroso 2009). Nestas condições experimentais foi analisada a expressão génica por análise de *microarrays*, tendo sido observadas variações na expressão de um total de 386 genes, correspondendo esses genes a 6% do total existente no genoma de *S. cerevisiae* (Pedroso 2009). Observou-se então uma resposta distinta daquela observada com a adição de H_2O_2 em *bolus* devido sobretudo às doses sub-letais de H_2O_2 às quais as células foram expostas e à maior especificidade da resposta celular (Pedroso 2009).

I.3.4. A regulação da expressão génica em condições de adaptação ao H₂O₂ em estado estacionário

O peróxido de hidrogénio é uma ROS que é continuamente produzida *in vivo* intracelularmente, como produto secundário do metabolismo aeróbio, e extracelularmente, como resultado de activação de células do sistema imunitário. É uma molécula pequena e neutra e portanto difunde-se facilmente através das membranas fisiológicas (Pedroso 2009). Foi demonstrado que a difusão de H₂O₂ através da membrana plasmática de *S. cerevisiae* limita a velocidade do consumo de H₂O₂ extracelular (Branco 2004, Sousa-Lopes 2004). Estas evidências refutam o paradigma vigente de que o H₂O₂ se difunde livremente através de biomembranas. Este novo modelo implica que sejam formados gradientes de H₂O₂ através das membranas (Pedroso 2009).

Como já foi referido as células de *S. cerevisiae* têm a capacidade de se adaptarem à presença de H₂O₂ através da aquisição de resistência. Foi visto que células expostas a doses sub-letais de H₂O₂ (150 µM H₂O₂ em estado estacionário durante 15-90 min) conseguem adaptar-se a exposições posteriores com doses letais (700 µM H₂O₂ em estado estacionário durante 60 min) através da aquisição de resistência. Isto é reflectido numa maior taxa de sobrevivência das células quando expostas a concentrações letais do mesmo agente (Pedroso 2009). Na levedura *S. cerevisiae* a resposta adaptativa ao *stress* oxidativo baseia-se principalmente no aumento da expressão dos enzimas que catalisam a eliminação do H₂O₂ e dos sistemas de reparação dos danos induzidos pelo H₂O₂ (Pedroso 2009). Porém foi demonstrado que durante a adaptação de células de *S. cerevisiae* ao H₂O₂ há também uma diminuição da permeabilidade da membrana plasmática ao H₂O₂, limitando o influxo deste agente (Branco 2004). A alteração da permeabilidade da membrana associada ao aumento da actividade dos enzimas que removem o H₂O₂ leva a um aumento do gradiente de H₂O₂ através da membrana (Branco 2004).

Na verdade, foi observado por análise de *microarrays*, em células sujeitas a de tratamento com 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário até 90 min, que existem alterações, tanto um aumento como uma diminuição da expressão génica de genes

envolvidos na resposta a estímulos químicos, resposta ao *stress*, homeostase celular, biossíntese de ergosterol, metabolismo lipídico, entre outros (Pedroso 2009). Mais tarde foi observado por Cepeda (2010), através do método de RT-PCR, que diversos genes regulados pelo inositol, também apresentam uma regulação em resposta ao tratamento com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário até 40 min, entre os quais o gene *ITRI* (Cepeda 2010). A autora observou que a expressão do gene *ITRI* diminui gradualmente ao longo do tempo de adaptação das células a 150 μM de H_2O_2 , tendo atingido níveis de expressão de mRNA de cerca de 75% e 60% relativamente ao controlo para os tempos de 20 e 40 minutos de exposição ao H_2O_2 , respectivamente.

II. OBJECTIVOS

A compreensão do(s) mecanismo(s) de regulação dos genes *ITR1* e *ITR2* e da proteína por ele codificada, a Itr1p, durante o processo de adaptação ao H₂O₂ são da maior importância pelas suas aplicações em problemas ligados à saúde humana, nomeadamente o mecanismo de sobrevivência e adaptação celular em condições de *stress* oxidativo.

Assim, o principal objectivo deste projecto consiste em estudar o mecanismo de regulação do transporte de inositol nas células de *S. cerevisiae* tratadas com 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário, ao longo do tempo, até 20 minutos de tratamento. Para isso pretende-se determinar:

a) os níveis membranares e totais dos transportadores de inositol (Itr1-GFPp e Itr2-GFPp)

Abordagem experimental: Determinação dos níveis dos transportadores por *Western Blot* nas células controlo (sem tratamento com H₂O₂) e nas células tratadas com 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário, durante vários tempos;

b) a localização celular dos transportadores de inositol Itr1-GFPp e Itr2-GFPp

Abordagem experimental: Visualização da localização celular e quantificação relativa dos transportadores através de microscopia de fluorescência em células tratadas com 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário, durante vários tempos;

c) os níveis de oxidação do transportador de inositol Itr1-GFPp

Abordagem experimental: Determinação do estado de oxidação dos transportadores através da reacção com MAL-PEG e subsequente *Western Blot* em células tratadas com 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário, durante vários tempos;

d) qual(ais) o(s) resíduo(s) de cisteína do transportador de inositol Itr1p que se oxida(m), no caso de haver oxidação

Abordagem experimental: modulação informática por homologia da proteína Itr1p para a percepção de quais os resíduos susceptíveis de sofrerem oxidação e análise da oxidação dos resíduos de cisteína por espectrometria de massa.

Como modelo experimental são utilizadas células de *S. cerevisiae*, tratadas com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário até 20 minutos de tratamento, utilizando o eléctrodo de oxigénio para monitorizar a concentração de H_2O_2 .

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Materiais

A Bacto peptona, o YNB (*Yeast Nitrogen Base*), o Bacto agar e o extracto de levedura (*yeast extract*) foram adquiridos da Difco (Detroit, MI, EUA). A glucose, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o dodecil sulfato sódico (SDS), o reagente de Folin, o persulfato de amónia (PSA) e o tween-20 foram obtidos da Merck (Whitehouse Station, NJ). Os aminoácidos do meio de crescimento, as esferas de vidro (\varnothing 425-600 μ m), a albumina de soro bovino (BSA), o N,N,N,N-tetraetilenodiamina (TEMED), o Azul Brilhante de Commassie R-250, o triton-x, o catalase (de fígado de bovino, E.C. 1.11.1.6) e o glucose oxidase (de *Aspergillus niger*, E.C. 1.1.3.4) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A proteína G-agarose (*Recombinant protein G-agarose beads*) foi obtida na Life Technologies/Invitrogen (Grand Island, NY, USA). O *cocktail* de inibidores de proteases *HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free* foi adquirido à Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). O N-etilmaleimida (NEM) foi obtido da BDH Chemicals (Radnor, PA, USA). A solução de acrilamida/bis-acrilamida 29:1 e o marcador de proteínas *Low Molecular Weight (LMW) Protein Marker* foram adquiridas da NZYtech (Lisboa, Portugal). A solução tampão de aplicação 4X *Laemmli Sample Buffer* e o equipamento de SDS-PAGE foram obtidos da BIO-RAD (Hercules, CA, USA). A glicina e o metanol foram obtidos da Fisher (Loughborough, UK). A membrana de nitrocelulose Protean BA 85 0,45nm e o papel de filtro Whatman 3MM foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA, USA). O kit de revelação de fluorescência ECL *Luminata Crescendo Western HRP Substrate* foi obtido da Millipore (Billerica, MA, USA). A maleimida metoxipolietilenoglicol (MAL-PEG) foi obtida da Fluka (St. Louis, MO, USA). Os anticorpos anti-GFP (SC9996 GFP (B-2) *mouse monoclonal*) e anti-mouse (SC2005 *goat anti-mouse IgG-HRP*) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). As chapas autoradiográficas Kodak Biomax MR, o reagente revelador e o reagente fixador foram adquiridos à Kodak (Rochester, NY, USA).

III.2. Material biológico

Ao longo do trabalho experimental foram utilizadas as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* que expressam o gene *ITR1-GFP* e o gene *ITR2-GFP*. As estirpes Itr1-GFPp e Itr2-GFPp foram adquiridas a partir de uma coleção de estirpes de levedura que expressam a proteína total com um *tag* no C-terminal que expressa o GFP (Huh 2003). A sequência codificante do *GFP* (de *Aequorea victoria* E.C. 1.13.12.5) foi inserida na grelha de leitura imediatamente atrás do codão STOP de cada *open reading frame* (ORF) (Huh 2003)

Foi ainda utilizada uma estirpe de *S. cerevisiae* selvagem haplóide (wt) com o seguinte genótipo: Y00000: *BY4741*, *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*.

III.3. Métodos Experimentais

III.3.1. Condições de Crescimento

O crescimento das culturas foi realizado em meio Sintético Completo (SC-*Syntethic Complete*) (Branco 2004). O meio SC é constituído por glucose 2% (m/v), YNB 6,85% (m/v), aminoácidos e bases – Triptofano 0,005% (m/v), Histidina 0,01% (m/v), Leucina, 0,01% (m/v), Adenina 0,0025% (m/v), Uracilo 0,0025% (m/v), Treonina, 0,02% (m/v), Serina 0,04% (m/v), Arginina 0,002% (m/v), Metionina, 0,002% (m/v), Tirosina, 0,003% (m/v), Isoleucina 0,003% (m/v), Lisina 0,005% (m/v), Metionina 0,005% (m/v), Valina 0,015% (m/v), Ácido Aspártico 0,01% (m/v) e Ácido Glutâmico 0,01% (m/v). As soluções necessárias para obter este meio foram autoclavadas a 120°C durante 20 min (YNB e glucose), enquanto as soluções de aminoácidos e bases foram autoclavadas a 110 °C durante 20 min.

Para o armazenamento das estirpes utilizadas foi usado meio YPD sólido, feito a partir de meio YP – Peptona 2% (m/v), *yeast extract* 1% (m/v) – suplementado com

Bacto agar 2% (m/v) e glucose 2% (m/v). O armazenamento a longo prazo foi feito em suspensão numa solução de glicerol 20% (m/v) a -80 °C. O armazenamento para utilização diária foi feito em placas com meio YPD sólido a 4 °C (com um máximo de duas renovações para uma nova placa a cada 30 dias).

O crescimento das leveduras foi realizado em meio líquido a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital. Os estudos foram realizados com culturas em fase de crescimento exponencial após a ocorrência de pelo menos duas duplicações, feitas a partir de pré-culturas crescidas durante cerca de 16h no dia anterior. As leituras para a determinação da concentração celular foram realizadas a 600 nm (Abs_{600}) num espectrofotómetro Genesys IOS UV-Vis obtido da Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) ($1\text{ OD a }600\text{ nm} \approx 2 \times 10^7$ células).

III.3.2. Curvas de Crescimento

Foi realizado um estudo do crescimento das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* em meio SC completo e da estirpe *ITR1-GFP* crescendo na ausência de inositol exógeno através da medida de Abs_{600} ao longo do tempo. Desta forma foi possível determinar quando as leveduras se encontravam nas várias fases de crescimento e definir a densidade celular da fase exponencial que interessa utilizar nas experiências a realizar.

Cada cultura foi inoculada com 0,03 OD/mL e colocada a crescer a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital; foram realizadas medições de Abs_{600} a cada 1h30 para a definição da curva de crescimento.

III.3.3. Determinação das constantes de consumo de H_2O_2 pelas células

As culturas foram inoculadas a 0,03 OD/mL a partir de pré-culturas crescidas do dia anterior, colocadas a crescer a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital até atingirem 0,15 OD/mL. Em seguida foi adicionado às culturas um volume de H_2O_2 , que estará a

uma concentração de 9 - 14 mM, de modo a que a sua concentração final fique a 150 μ M (dose sub-letal a sujeitar às células durante o tempo de adaptação das mesmas) (Branco 2004; Pedroso 2009).

Foi medida a diminuição da concentração de H_2O_2 presente nas culturas durante 60 min. As medições foram realizadas num eléctrodo de Clark (Hansatech Instruments, UK). A medição foi realizada através da adição de 400 μ L da solução tampão de fosfatos de potássio 0,1 M pH 6,5 (TFK 0,1M pH 6,5) e 400 μ L de cultura no eléctrodo. A esta solução adicionou-se 10 μ L de catalase 1 mg/mL. O sinal do eléctrodo corresponde ao oxigénio libertado pela dismutação do H_2O_2 . Assim é possível determinar a concentração de H_2O_2 presente na cultura a cada instante recorrendo a uma curva de calibração realizada previamente no próprio dia. Esta curva é realizada através da calibração do eléctrodo com várias soluções de H_2O_2 a várias concentrações conhecidas (entre 18 a 162 μ M) feitas a partir de uma solução de H_2O_2 que estará a uma concentração de 9 - 14 mM. A concentração precisa da solução mãe foi determinada através da Abs_{240} de uma diluição 1/1000 ($\epsilon = 43,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

A constante de consumo de H_2O_2 , $k \text{ (min}^{-1}\text{)}$, corresponde ao declive da recta obtida por regressão linear dos pontos obtidos através da representação gráfica de $\ln [H_2O_2]$ em função do tempo (min).

O consumo de H_2O_2 depende da concentração de células presentes em cada ensaio. Assim sendo, para se poder determinar o valor de consumo necessário à criação estado estacionário e subsequente adaptação com H_2O_2 , é necessário normalizar em função da concentração de células em cada ensaio. O consumo de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD/mL})^{-1}$) é assim obtido a partir da razão entre $k \text{ (min}^{-1}\text{)}$ e Abs_{600}/mL que a cultura apresenta no início do ensaio.

$$\text{Consumo de } H_2O_2 \text{ (min}^{-1} \cdot (\text{OD/mL})^{-1}\text{)} = \frac{k \text{ (min}^{-1}\text{)}}{Abs_{600}/\text{mL}}$$

Equação 1 – Equação do consumo de H_2O_2 pelas células

III.3.4. Adaptação das células a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário

A adaptação de leveduras a H_2O_2 é conseguida por exposição das células a uma dose sub-letal de H_2O_2 (150 μM) em estado estacionário durante 15 - 90 min (Branco 2004). A adaptação iniciou-se com células em fase de crescimento exponencial a uma concentração de 0,15 OD/mL. Para a criação do estado estacionário adicionou-se conjuntamente H_2O_2 150 μM e o enzima glucose oxidase às culturas numa quantidade cuja produção de H_2O_2 por este enzima igualasse o consumo de H_2O_2 pelas células. Assim a concentração de H_2O_2 no meio foi mantida constante.

Durante o tempo de adaptação das células o H_2O_2 presente foi medido pelo eléctrodo de Clark, do modo referido anteriormente, com o intuito de confirmar que a concentração de H_2O_2 era mantida constante. Caso a concentração de H_2O_2 variasse por aumento da densidade celular ao longo do tempo, tanto o glucose oxidase como o H_2O_2 eram adicionados à cultura de modo a compensar a variação.

A actividade do glucose oxidase foi determinada previamente no laboratório, tendo o seu valor sido utilizado para os cálculos do estado estacionário (0,0010400 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}/\text{min}$, diluição 1/10000).

III.3.5. Quantificação dos transportadores Itr1-GFPp e Itr2-GFPp nas membranas e nas células totais

III.3.5.1. Obtenção dos extractos membranares

Os extractos membranares obtidos a partir de células intactas foram preparados de acordo com o método descrito por Grossman e colaboradores (Grossman 2008) com algumas alterações. Neste método foram inoculados 50 mL de cultura a 0,03 OD a partir de uma pré-cultura preparada no dia anterior e deixado crescer até uma fase de

crescimento exponencial, com pelo menos duas duplicações (0,15 OD) em agitação orbital. A 0,15 OD/mL as culturas foram adaptadas com H₂O₂ 150 µM, como descrito anteriormente, e recolhidas amostras durante os vários tempos a testar (5 min, 10 min e 20 min). As células foram recolhidas aos tempos descritos e centrifugadas a 4000 rpm durante 1 min (Sigma_302), lavadas com 500 µL de uma solução tampão TNE (Tris-HCL 50mM pH 7,4; NaCL 150mM; EDTA 5mM) e ressuspensas em 200 µL de TNE-I (solução tampão TNE suplementado com o *cocktail* de inibidores de proteases *Halt*TM 1% (v/v)). Imediatamente após a ressuspensão, as células intactas foram congeladas em azoto líquido para posterior utilização.

Para a obtenção dos extractos membranares, as células foram descongeladas e rebentadas através da adição de um volume equivalente a 200 µL de esferas de vidro (Ø 425-600 µm) e agitadas num vortex 7x1min alternado com 7x1min de permanência em gelo. Em seguida foram realizadas três centrifugações a 2300 rpm (1min + 2x 5min) a 4°C (Sigma_202 MK) para remoção de restos celulares. Nestas centrifugações o sedimento foi desprezado e o sobrenadante recolhido. Para a obtenção da fracção membranar o sobrenadante recolhido foi submetido a uma centrifugação a 14000 rpm durante 1h15 a 4°C (Sigma_202 MK). O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento, equivalente à fracção das membranas celulares, ressuspensão em 100 µL de TNE-I, para posterior quantificação e análise das proteínas por SDS-PAGE.

III.3.5.2. Obtenção dos extractos totais

As células intactas para a obtenção de extractos totais foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no ponto **III.3.5.1.**

Para a preparação dos extractos totais as células foram descongeladas e rebentadas através da adição de um volume equivalente a 200 µL de esferas de vidro (Ø 425-600 µm) e agitadas num vortex 7x1min alternado com 7x1min de permanência em gelo. Para proceder à preparação e análise dos extractos totais, foi adicionado à suspensão anterior uma solução de SDS 10% (v/v) para uma concentração final de 2% (v/v) e 25 µL da solução tampão de aplicação 4X concentrada (III.1), seguindo-se um

aquecimento a 40 °C durante 30 min. Em seguida a solução foi centrifugada a 2000 rpm durante 1 min (Eppendorf Mini-Spin) e retirada uma alíquota de 150 µL do sobrenadante, para posterior análise das proteínas por SDS-PAGE.

III.3.5.3. Quantificação de proteínas pelo método de Peterson

Para o doseamento proteico adicionou-se 100 µL de extracto proteico das membranas diluído 1/40 a 900 µL de H₂O, ao qual se adicionou 1 mL de reagente de cobre-tartarato (1 volume de CuSO₄.5H₂O 0,1% (m/v), tartarato de sódio 0,2% (m/v), Na₂CO₃ 10% (m/v); 2 volumes de SDS 5% (m/v) e 1 volume de NaOH 0,8M). Agitou-se no *vortex* e ao fim 10 min adicionou-se 500 µL de reagente de Folin diluído 1/7. Ao fim de 1h de incubação foram efectuadas leituras de absorvência a 750 nm num espectrofotómetro (Genesys IOS UV-Vis).

A curva padrão foi feita adicionando volumes adequados de uma solução de BSA 0,1 mg/mL, preparada previamente a partir de uma solução de BSA 5mg/mL, perfazendo o volume de 1 mL. Foram adicionados volumes de BSA 0,1 mg/mL de modo a ter soluções de BSA com as concentrações finais de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. A cada solução padrão adicionou-se 1 mL de reagente de cobre-tartarato e procedeu-se como descrito anteriormente. Para a quantificação, as amostras e os padrões foram preparadas e analisadas em triplicado.

III.3.6. Análise das proteínas por *Western Blot*

A análise por *Western Blot* permite identificar proteínas específicas e determinar a quantidade destas numa mistura de proteínas. Nesta técnica as proteínas são separadas por electroforese num gel desnaturante (SDS-PAGE), transferidas para uma membrana de nitrocelulose e ligadas com anticorpos específicos, que permitem a sua imunodeteção e respectiva quantificação.

III.3.6.1. Separação das proteínas por SDS-PAGE

Para separação das proteínas dos extractos proteicos obtidos foi realizada uma electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) utilizando para isso um aparelho de mini-gel BIORAD Mini-Protean II. Neste sistema os géis são verticais e funcionam em modo descontínuo, sendo compostos por um gel de concentração contíguo a um gel de resolução. O gel de resolução é composto por acrilamida/bis-acrilamida (29:1) 8% (m/v), Tris-HCl 0,372 M pH 8,8 e SDS 0,001% (m/v), aos quais se adicionaram os agentes polimerizantes TEMED 0,06% (v/v) e PSA 0,001% (m/v). O gel de concentração é constituído por acrilamida/bis-acrilamida (29:1) 5% (m/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 e SDS 0,001% (m/v), aos quais se adicionaram os agentes polimerizantes TEMED 0,1% (v/v) e PSA (0,001%) (m/v).

Após efectuar a extracção e o doseamento proteico dos extractos membranares como descrito anteriormente, foram preparadas as amostras para aplicação nos géis. Calculou-se o volume de extracto necessário para aplicar entre 40 - 100µg de proteínas dependendo da estirpe em análise. A cada volume de amostra foi adicionado H₂O até perfazer o volume final desejado (40 - 50 µL). Por fim foi adicionado a esta solução SDS para uma concentração final de 2% (v/v) e 5 µL de solução tampão de aplicação. As amostras foram então aquecidas a 40°C durante 30 min e aplicadas no gel. Como referência das massas moleculares das proteínas foram aplicados 6 µL de uma solução de marcador de proteínas. Para a análise dos extractos totais preparados em **III.3.5.2**, aplicaram-se nos respectivos poços dos géis de poliacrilamida 10 - 40 µL de cada amostra e 6 µL de marcador de proteínas. A electroforese decorreu utilizando tampão de electroforese, composto por Tris base 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). A separação electroforética realizou-se a 20 - 30 mA por gel e a electroforese era dada por terminada quando a linha da frente atingia a zona final do gel.

III.3.6.2. Transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, as proteínas dos géis de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Protean BA 85 0,45nm).

Os géis foram colocados a equilibrar com solução tampão de transferência (Tris 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,0375%; (m/v); metanol 20% (v/v) (Bjerrum 1986) durante 15 min. A membrana de nitrocelulose foi cortada com as dimensões correspondentes ao tamanho do gel e molhada em H₂O, antes de ser colocada a equilibrar com o tampão de transferência. Cortaram-se 12 unidades de papel de filtro 3 MM com as dimensões correspondentes à da membrana cortada previamente e saturaram-se com tampão de transferência.

Colocaram-se 6 unidades de papel de filtro previamente saturado com solução tampão de transferência no aparelho de transferência (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell obtido da BIO-RAD) retirando-se as bolhas. Em seguida colocou-se a membrana de nitrocelulose sobre as folhas de papel de filtro, seguindo-se o gel previamente equilibrado em tampão de transferência, tendo o cuidado de não deixar bolhas entre o gel e a membrana. No final colocaram-se as restantes 6 unidades de papel de filtro previamente saturado com tampão de transferência sobre o gel, novamente retirando as bolhas. Colocou-se o cátodo e a tampa do aparelho de transferência e iniciou-se a transferência com 0,8 mA/cm² de membrana de nitrocelulose durante 1h10 min.

Após a transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com uma solução de Ponceau S (Ponceau S 0,2 % (m/v), TCA 3 % (m/v), ácido sulfosalicílico 3 % (m/v)), lavada com água destilada para retirar o excesso de corante e guardada para posterior análise

III.3.6.3. Imunodeteção

Para a visualização e quantificação das proteínas Itr1-GFPp e Itr2-GFPp nos diferentes extractos proteicos recorreu-se ao método de imunodeteção, utilizando um anticorpo anti-GFP específico.

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução tampão de fosfato-salino, PBS (Na_2HPO_4 8 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM pH 7,4), contendo leite magro desnatado 5% (m/v) (PBS + leite magro desnatado) durante 1h em agitação orbital. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário anti-GFP (SC9996 GFP(B-2) *mouse monoclonal*) diluído 1/1000 em PBS contendo leite magro desnatado durante 1 - 2h com agitação orbital. No final desta incubação a membrana foi lavada com PBS contendo tween-20 0,1% (v/v) (PBS + tween-20) 2x15 min em agitação orbital. A membrana foi então incubada com o anticorpo secundário *anti-mouse* (SC2005 *goat anti-mouse* IgG-HRP) diluído 1/4000 em PBS contendo leite magro desnatado durante 1h com agitação orbital. Após a incubação a membrana foi lavada com PBS 2x15 min em agitação orbital. A visualização do complexo proteína-anticorpo foi realizada através adição de substrato do peroxidase acoplado ao anticorpo secundário (*Luminata Crescendo Western HRP Substrate*) e revelação no ImageQuant (LAS-500) ou por revelação em câmara escura com chapas autoradiográficas.

III.3.7. Análise de amostras por microscopia de fluorescência

De modo a visualizar as proteínas Itr1-GFPp e Itr2-GFPp, prepararam-se amostras e visualizou-se a fluorescência das proteínas por microscopia de fluorescência.

De modo a se obter os extractos celulares, as células tratadas e não tratadas com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário foram crescidas até 0,15 OD/mL, a partir da inoculação de 25 mL de meio SC (com e sem inositol) a uma densidade celular de 0,03 OD/mL. Foi recolhido 1 mL de cultura das células tratadas e não tratadas com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário seguida de uma centrifugação a 8500 rpm (Eppendorf

Mini-Spin) durante 1 min. O sedimento foi ressuspensão com o sobrenadante residual e retirados 3 μ L para aplicação em lâminas para visualização por microscopia de fluorescência.

As lâminas foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Rines e colaboradores (Rines 2011) com algumas alterações. Foi preparada uma solução de agarose 1% (m/v) e aliquoteada em *eppendorfs* com 1 mL de solução. Cada alíquota foi aquecida em banho seco no dia de utilização a 90 °C. Foi colocada fita-cola *scotch-tape* em ambos os lados da lâmina de vidro. Em seguida foram aplicados 30 μ L de agarose 1% (m/v) quente no centro da lâmina e tapada a lâmina com outra lâmina de vidro pressionando ligeiramente a agarose. A montagem realizada foi deixada arrefecer 30 s em cima de uma placa a -20 °C. Após o arrefecimento, retirou-se a lâmina de vidro superior cuidadosamente de modo a não arrastar a agarose.

A emissão de fluorescência por parte das células foi observada num microscópio *Olympus BX41*, tendo-se procedido à recolha de imagens utilizando uma máquina fotográfica *Olympus Digital Camera Camedia C-4040 ZOOM, CCD 4 100 000 Pixels*.

III.3.8. Determinação de cisteínas oxidadas utilizando MAL-PEG

A maleimida metoxipolietilenoglicol (MAL-PEG) é um composto que se liga irreversivelmente a cisteínas reduzidas. Neste trabalho utilizou-se MAL-PEG com uma massa molecular de 5 KDa. Assim as proteínas marcadas com MAL-PEG, pela sua mobilidade electroforética reduzida pela ligação do MAL-PEG, podem ser facilmente identificadas após separação por SDS-PAGE.

De modo a realizar a reacção com o MAL-PEG, as células tratadas e não tratadas com 150 μ M de H₂O₂ em estado estacionário foram recolhidas como descrito anteriormente no ponto **III.3.5.2.**, com a diferença de se ter adicionado ácido tricloroacético 10% (m/v) (TCA) às culturas e incubadas durante 1 min com agitação previamente à sua congelação em azoto líquido (Garcia-Santamarina 2014). Para a

obtenção dos extractos de proteínas celulares totais, os sedimentos foram ressuspensos em 250 µL de TCA 12,5% (m/v), adicionados 250 µL de esferas de vidro (Ø 425-600 µm) e agitados num *vortex* 7x1min alternado com 7x1min de permanência em gelo. Em seguida o sobrenadante foi recolhido furando o tubo *eppendorf* no fundo com uma agulha e sendo este colocado em cima de outro tubo *eppendorf* (Garcia-Santamarina 2014). Este conjunto foi submetido a uma centrifugação a 850 rpm durante 30 s a 4 °C (Sigma_MK2). O sobrenadante recolhido foi então submetido a uma nova centrifugação a 20000 rpm durante 20 min a 4 °C (Sigma_MK2). O sobrenadante obtido foi desprezado e o sedimento lavado duas vezes com 1 mL de acetona arrefecida a -20 °C. O sedimento foi deixado secar e foi adicionado 200 µL de solução de lise (Tris-HCl 0,2 M pH 8; SDS 3% (m/v); glicerol 5% (v/v); EDTA 1 mM). O extracto obtido foi quantificado pelo método de Peterson como descrito no ponto **III.3.5.3**. Foram alíquotadas várias amostras de 100 µg de extracto membranar e incubadas com uma solução de MAL-PEG 4 mM durante 30 min à temperatura ambiente seguido de 5 min a 37 °C. No final desta incubação adicionou-se ditionitreitol (DTT) para uma concentração final de 10 mM (Xiao 2004). De forma a termos controlos das proteínas totalmente reduzidas e totalmente oxidadas, foram preparadas amostras controlo tratadas com um agente redutor e um agente oxidante respectivamente. Para a amostra de controlo reduzido foi adicionado DTT até uma concentração final de 10 mM e incubada durante 30 min à temperatura ambiente. Para a amostra de controlo oxidado foi adicionado ácido ditionitrobenzóico (DTNB) até uma concentração final de 1 mM e incubado durante 30 min à temperatura ambiente. No final destas incubações os extractos tratados foram precipitados com uma solução de TCA até uma concentração final de 20% (m/v) e os sedimentos obtidos após uma centrifugação a 20000 rpm durante 20 min a 4 °C (Sigma_MK2) foram também incubados com MAL-PEG nas condições descritas anteriormente. No final, foi adicionado 6 µL de solução tampão de aplicação a todas as amostras. As amostras foram aquecidas a 80 °C durante 3 min e analisadas num gel de poliacrilamida 7,5% (m/v), tal como descrito no ponto **III.3.6.1**. No final da electroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose como descrito no ponto **III.3.6.2**. Para a visualização e quantificação da proteína Itr1-GFPp no extractos membranar foi realizado um protocolo semelhante ao descrito no ponto **III.3.6.3**.

III.3.9. Determinação da oxidação de cisteínas por imunoprecipitação e espectrometria de massa

III.3.9.1. Obtenção das células para preparação de extractos membranares para imunoprecipitar

Para a obtenção de extractos membranares a partir de células intactas foi realizado um procedimento semelhante ao descrito no ponto **III.3.5.1**, até ao ponto de recolha de células a partir da cultura. Após a recolha, as células foram lavadas com 500 µL de uma solução tampão TNE suplementado com N-etilmaleimida 20 mM (NEM) (TNE + NEM) e ressuspensas em 200 µL de TNE-I suplementado com NEM (TNE-I + NEM 20 mM). As células foram então incubadas durante 30 min a 4 °C. Imediatamente após a incubação as células foram congeladas em azoto líquido para posterior utilização.

III.3.9.2. Preparação do extracto proteico de membranas para imunoprecipitação

Para a obtenção de extractos as células foram descongeladas e rebentadas através da adição de um volume equivalente a 200µL de esferas de vidro (Ø 425-600 µm) e agitadas num vortex 7x1min alternado com 7x1min de permanência em gelo. Em seguida foram realizadas três centrifugações a 2300 rpm (1min + 2x 5min) a 4°C (Sigma_202 MK) para remoção de restos celulares. Nestas centrifugações o sedimento foi desprezado e o sobrenadante recolhido. Para a obtenção da fracção membrana o sobrenadante recolhido foi submetido a uma centrifugação a 14000 rpm 1h15 a 4°C (Sigma_202 MK). O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento ressuspensão com uma solução tampão de imunoprecipitação, IP (Na₂HPO₄ 15 mM, NaCl 150 mM, Triton-X 0,1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), desoxicolato 0,5% (m/v), EDTA 10 mM) suplementado com inibidores de proteases 1% (v/v) e NEM 20 mM (IP + inibidores de proteases + NEM) e incubado durante 30 min a 4 °C. As proteínas foram precipitadas

durante a noite a -20 °C com 4 volumes de acetona fria de modo a remover o excesso de NEM.

O precipitado proteico foi obtido após uma centrifugação a 15000 rpm durante 15 min a 4°C (Sigma_202 MK). O sedimento foi deixado a secar até não haver mais acetona presente e ressuspendeu-se com 500 µL de IP-I.

III.3.9.3. Precipitação do complexo proteína-anticorpo

Para a obtenção do precipitado do complexo anticorpo anti-GFP-Itr1-GFPp foram adicionados 100 µL da suspensão de Proteína G-Agarose (*beads*) e a solução incubada durante 1h a 4 °C com agitação. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 12000 rpm durante 20 s (Eppendorf Mini-Spin) para recuperar o sedimento. Lavou-se o sedimento 3x1 mL com a solução IP e uma vez com solução de lavagem (Tris base 50 mM pH 8) retirando o sobrenadante no final com muito cuidado de modo a não arrastar as *beads*.

III.3.9.4. Dissociação e análise

De modo a dissociar a Itr1-GFPp das Proteína G Agarose o sedimento foi ressuspenso em 30 µL de solução tampão de amostra contendo SDS 1% (m/v), DTT 100 mM, Tris base 50 mM pH 7,5 durante 1 min. Em seguida as amostras foram aquecidas a 95 °C durante 3 min e posteriormente centrifugadas a 12000 rpm durante 20 s para remoção da Proteína G Agarose e recolhido o sobrenadante, que contém as proteínas imunoprecipitadas. Adicionou-se 1 µL de uma solução de azul de bromofenol e glicerol (azul de bromofenol 1% (m/v), glicerol 8% (v/v)) ao sobrenadante anterior e aplicou-se a amostra num gel de poliacrilamida 7,5% (m/v), segundo o procedimento descrito em **III.3.6.1**.

Após a realização do gel, este foi corado com uma solução de azul de Commassie (Azul Brilhante de Commassie R-250 0,1% (m/v), metanol 40% (v/v),

ácido acético 10% (v/v)) e a banda correspondente à Itr1-GFPp foi removida com o auxílio de um bisturi. A banda foi então submetida a espectroscopia de massa. De modo a confirmar a localização da banda no gel foi realizado um *Western Blot*, tal como descrito nos pontos **III.3.6.2** e **III.3.6.3**.

III.3.10. Quantificação de fluorescência das imagens através do programa ImageJ

De forma a quantificar a fluorescência relativa das várias amostras recolhidas utilizou-se o programa ImageJ (Abramoff 2004) nas imagens das bandas de fluorescência obtidas por *Western Blot*, o que possibilita uma quantificação dos pixéis correspondentes a cada banda e, assim, uma quantificação relativa das mesmas. Cada conjunto de bandas foi delimitado utilizando a ferramenta de selecção do programa e seleccionado através da ferramenta *Analyze-Gels-Select First Lane*. Em seguida os pixéis de cada banda foram quantificados através da ferramenta *Analyze-Gels-Plot Lanes*. Com esta ferramenta obtém-se um gráfico com os valores relativos da quantificação dos pixéis de cada banda. De modo a obter-se os valores na forma de números da quantificação realizada, foi traçada uma linha de base para cada pico do gráfico obtido através da ferramenta de criação de linhas e, através da ferramenta *Wand*, obtidos os valores de quantificação relativa de cada pico do gráfico. No caso da quantificação de imagens de membranas coradas com Ponceau S, os valores foram normalizados em relação ao maior valor obtido de forma a se obter os factores de correcção para as imagens de imunodeteccção correspondentes. No caso das imagens de imunodeteccção, os valores obtidos foram multiplicados pelo factor de correcção obtido pela quantificação das imagens de membranas coradas com Ponceau S e calculadas as percentagens em relação ao valor da amostra controlo.

III.3.11. Análise estatística

Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de n experiências independentes. A comparação das medianas dos valores foi realizada utilizando um ANOVA (*analysis of variance*) com uma pós-teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando para tal o programa Sigma Stat versão 3.5. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objectivo do presente trabalho consistiu em compreender como se processa a regulação dos transportadores de inositol, Itr1-GFPp e Itr2-GFPp, durante o processo de adaptação a 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário. É proposto que o H_2O_2 inibe o transporte de inositol, que por sua vez regula a expressão e degradação dos transportadores, através da oxidação de cisteínas dos transportadores. Para este estudo é essencial quantificar e determinar a localização na célula destes transportadores e observar, no caso de haver alterações destes parâmetros, qual(ais) o(s) resíduo(s) de cisteína que sofre(m) oxidação durante este processo.

Para a quantificação dos transportadores optou-se pelo método de *Western Blot*. Este método tem uma sensibilidade adequada no caso da quantificação da proteína Itr1-GFPp uma vez que esta existe numa quantidade considerável na membrana. No entanto, no caso da proteína Itr2-GFPp, este método apresenta uma sensibilidade reduzida pois a proteína existe em muito pouca quantidade nas células de *S cerevisiae*. Esta falta de sensibilidade, aliada à impossibilidade de realizar um método com maior sensibilidade, levou a que se tivesse de realizar mais experiências de modo a diminuir a dispersão dos resultados obtidos.

No caso da determinação da localização celular dos transportadores, pela visualização por microscopia de fluorescência, o método utilizado foi adequado para a Itr1-GFPp pois conseguiu-se visualizar a alteração da sua localização celular durante a adaptação com H_2O_2 . No caso da Itr2-GFPp não foi possível visualizar a sua localização celular através deste método pois o sinal obtido era demasiado fraco, mais uma vez derivado da sua escassa quantidade na célula.

No que respeita à realização dos dois últimos objectivos do trabalho apenas se conseguiu obter resultados preliminares, que não apresentam a robustez que os resultados da determinação dos níveis membranares e totais dos transportadores de inositol e da determinação da localização celular dos transportadores de inositol por microscopia de fluorescência apresentam.

Desta forma os resultados apresentados seguem a ordem dos objectivos apresentados, nomeadamente, determinação dos níveis totais dos transportadores de inositol (Itr1-GFPp e Itr2-GFPp), determinação da localização celular dos transportadores de inositol, determinação dos níveis de oxidação dos transportadores de inositol e determinação de qual(ais) o(s) resíduo(s) de cisteína dos transportadores de inositol que se oxida(m), no caso de haver oxidação nestas moléculas.

IV.1. Caracterização das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP*

Neste trabalho foram utilizadas as estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP*, pois estas estirpes contêm inseridas nos seus genes genómicos *ITR1* e *ITR2*, respectivamente, a região codificante da GFP o que permite às proteínas que codificam, Itr1-GFPp e Itr2-GFPp respectivamente, serem identificadas pela utilização de um anticorpo específico anti-GFP. Esta característica é uma vantagem em termos de utilização pois não existem anticorpos específicos para as proteínas em questão. Além desta razão, a utilização de estirpes com a região codificante do GFP inserida no genoma, ao invés da utilização de uma levedura transformada com um plasmídeo, é uma vantagem pois permite manter as zonas de regulação dos genes *ITR1* e *ITR2*, o que aproxima os níveis das proteínas por eles codificados aos que ocorrem na realidade.

Os estudos de adaptação de *S. cerevisiae* ao H₂O₂ são normalmente realizados com as células em fase exponencial de crescimento. Nesta fase as células encontram-se em maior actividade metabólica, transcricional e traducional, pelo que a resposta adaptativa ao *stress* é mais robusta e eficaz (Sousa-Lopes 2004). Inicialmente foram caracterizadas em relação ao seu crescimento as estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC completo e a estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC com ausência de inositol (*ITR1-GFP* sem inositol) (Figura 1). Esta caracterização foi conseguido através da realização das suas curvas de crescimento. A comparação do crescimento das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* com a estirpe wt é relevante uma vez que permite analisar se a inserção da região codificante da GFP nos genes *ITR1* e *ITR2*, respectivamente, tem efeitos a nível metabólico e biológico da levedura. Para a comparação com a estirpe selvagem (estirpe wt) foram utilizados os dados de curvas de

crescimento desta levedura realizadas previamente neste laboratório (Cepeda 2010). Relativamente à comparação do crescimento da estirpe *ITR1-GFP* com a estirpe *ITR1-GFP* sem inositol é importante pois permite perceber o efeito deste metabolito no crescimento da levedura. De notar que este metabolito não é essencial ao crescimento da levedura pois pode ser sintetizado endogenamente, no entanto é um elemento regulador importante na célula. A caracterização das células crescidas na ausência de inositol é importante na medida em que permite perceber o tempo necessário às leveduras para atingirem as diferentes fases de crescimento, permitindo também definir as condições de adição de H_2O_2 às células crescidas sem inositol para estabelecer o estado estacionário. Na Figura 1 encontram-se representadas uma parte das curvas de crescimento das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* em meio SC completo da estirpe e *ITR1-GFP* sem inositol.

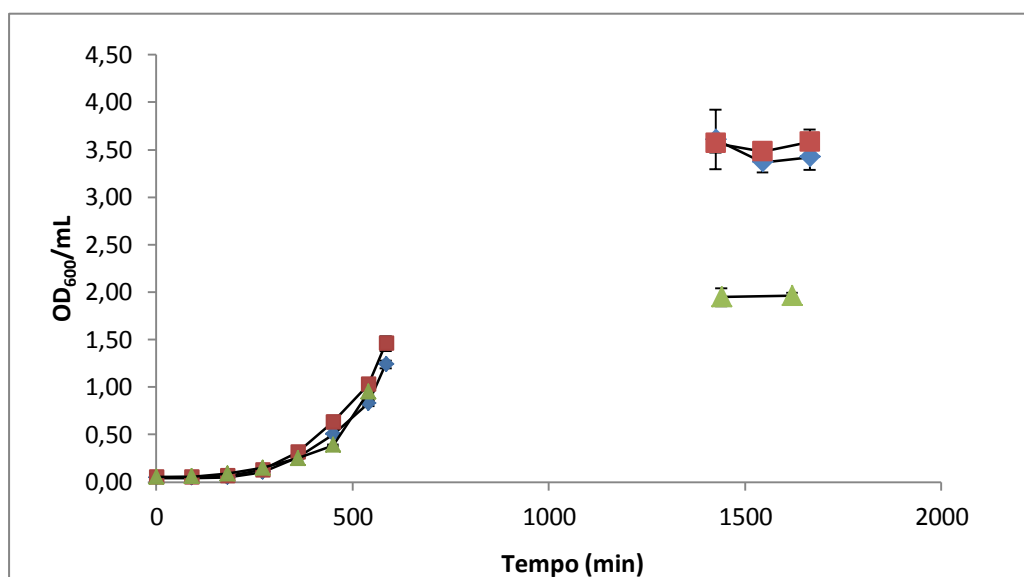


Figura 1 – Representação de parte das curvas de crescimento das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol. Representação gráfica de OD₆₀₀/mL em função do tempo (min) para as estirpes: ◆ *ITR1-GFP* e ■ *ITR2-GFP* crescidas em meio SC; ▲ *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol. Para cada ensaio foram inoculadas culturas a 0,03 OD₆₀₀/mL (1 OD₆₀₀/mL \approx 2×10^7 células/mL), a partir de pré-culturas, colocadas a crescer a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital, sendo o seu crescimento seguido através da medição da absorvência a 600 nm. Os pontos experimentais correspondem à média \pm desvio padrão das leituras obtidas em três experiências independentes.

Analisando as curvas de crescimento das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol é possível observar um crescimento bastante lento nos primeiros 180-240 min, onde as células se encontram em adaptação aos nutrientes existentes no meio de cultura – fase *lag*. A fase de crescimento exponencial foi observada a partir dos 250 min de crescimento até aos 585 min, ponto onde se parou as leituras no dia. Não foi realizado o restante da curva de crescimento pois já tinham sido obtidos os pontos necessários aos cálculos requeridos para a determinação da taxa de crescimento específico e do tempo de geração. No entanto foram feitas leituras aos 1425-1665 min, que correspondem à fase estacionária. Estas leituras em fase estacionária permitem observar e comparar os valores máximos de densidade celular para cada cultura. Como se pode observar na Figura 1, as estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC atingem um valor de densidade celular máximo semelhante entre si (cerca de 3,5 OD₆₀₀/mL) enquanto a estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol atinge um valor de densidade celular máximo muito menor (cerca de 2 OD₆₀₀/mL).

Através da linearização dos valores de OD₆₀₀/mL em função do tempo (min) foram determinadas as taxas de crescimento específico (μ) e o tempo de geração (t_g) a partir da fase exponencial de crescimento para as três estirpes. Os valores calculados para as diferentes estirpes encontram-se representados no Quadro 1 e representados graficamente na Figura 2. Os valores da estirpe wt apresentados correspondem aos valores calculados previamente no laboratório (Cepeda 2010).

Quadro 1 – Valores de taxa de crescimento específico (μ) e tempo de geração (t_g) calculados para as estirpes wt, *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e *ITR1-GFP* crescidas em meio SC sem inositol, a partir das respectivas curvas de crescimento. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. * $p < 0,05$ vs *ITR1-GFP*.

	μ (min ⁻¹)	Tempo (min)
<i>ITR1-GFP</i>	0,0073 \pm 0,0003	94,519 \pm 3,998
<i>ITR2-GFP</i>	0,0074 \pm 0,0003	93,243 \pm 2,720
<i>ITR1-GFP</i> s/ inositol	0,0067 \pm 0,0002 *	115,460 \pm 3,746
wt	0,0076 \pm 0,0006	91,810 \pm 6,839

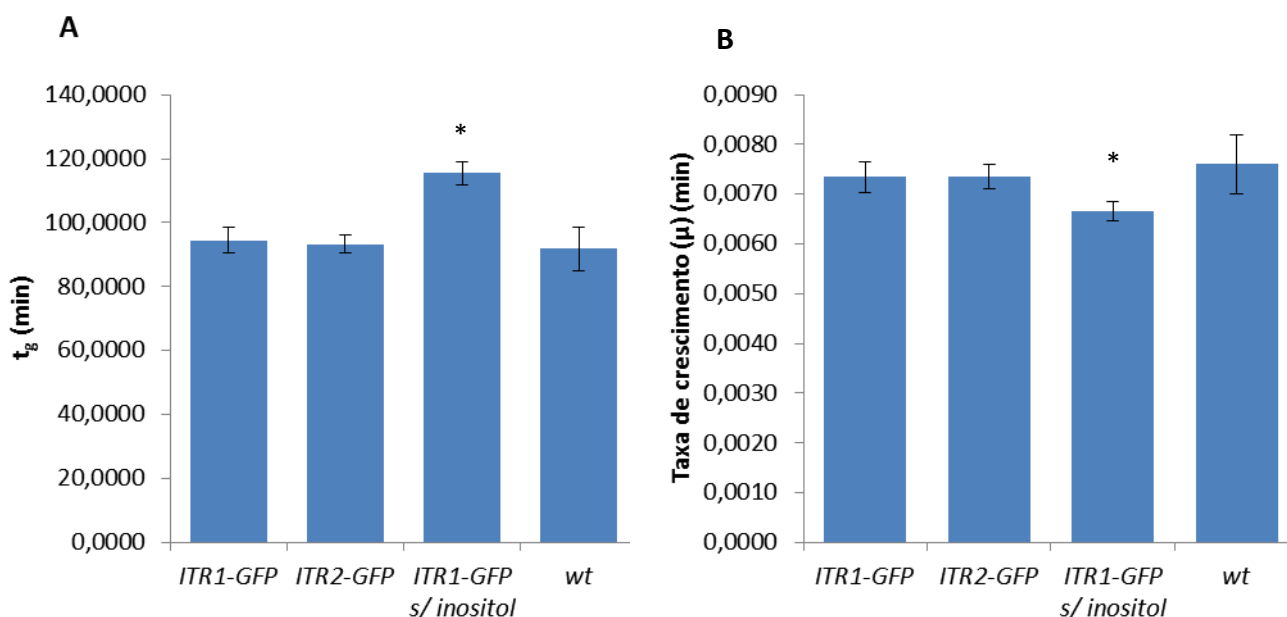


Figura 2 – Representação gráfica dos valores de taxa de crescimento específico (μ) e tempo de geração (t_g) calculados para as estirpes wt, *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol. Representação gráfica dos valores de (A) t_g (tempo de geração) e (B) μ (taxa de crescimento específico) calculados para as estirpes wt, *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol, com base nas respectivas curvas de crescimento. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão pelo menos três experiências independentes. * $p < 0,05$ vs *ITR1-GFP*.

A estirpe wt demora aproximadamente 90 min a duplicar a sua população ($t_g = 91,810 \pm 6,839$ min) (Cepeda 2010). A partir dos resultados apresentados no Quadro 1, observou-se que a inserção da região codificante da GFP, nos casos das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP*, não acarreta consequências no funcionamento metabólico uma vez que o tempo de geração e taxa de crescimento específico se mantêm estatisticamente inalterados (Quadro 1, Figura 2A e Figura 2B). No caso da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol observou-se um aumento do tempo de geração para aproximadamente 115,46 min e uma diminuição da taxa de crescimento específico para $0,0067 \text{ min}^{-1}$, relativamente à estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC, como era expectável. Este resultado era expectável dado que o inositol é um importante regulador celular (Gaspar, 2006; Jesch, 2005), logo a ausência deste elemento irá afectar o metabolismo de crescimento celular.

IV.2. Optimização das condições para estabelecer o estado estacionário de H₂O₂

Com as estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* caracterizadas relativamente ao crescimento celular, foi possível iniciar a optimização das condições para o estabelecimento do estado estacionário de H₂O₂ nestas estirpes. O estado estacionário de H₂O₂ é caracterizado pela manutenção da concentração de H₂O₂ no meio de crescimento celular, sujeitando assim as células a uma concentração não variável de H₂O₂, como acontece fisiologicamente.

Para estabelecer o estado estacionário de 150 µM de H₂O₂ foi necessário determinar a constante de consumo de H₂O₂ das estirpes estudadas de modo a que a produção de H₂O₂ na cultura pelo enzima glucose oxidase fosse equivalente ao consumo de H₂O₂ pelas células. A actividade específica do enzima glucose oxidase utilizada nos cálculos (1,04 x10⁻³ µmol/min/µL) foi determinada previamente no laboratório.

IV.2.1. Consumo de H₂O₂ pelas células

A determinação do consumo de H₂O₂ pelas células foi realizado em concordância com o procedimento referido em **III.3.3**. Os valores de constante de consumo (k, min⁻¹) e de consumo de H₂O₂ (min⁻¹.(OD/mL)⁻¹) obtidos, considerando a normalização referida no ponto **III.3.3**., encontram-se apresentados no Quadro 2 e representados na Figura 3.

Analisando os valores de consumo de H₂O₂ para as várias estirpes apresentados no Quadro 2 e representados na Figura 3, pode observar-se que as células da estirpe *ITR1-GFP* crescidas em meio SC consomem H₂O₂ a uma velocidade maior quando comparadas com a estirpe wt.

Quadro 2 – Consumo de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}$) e constante de consumo (k , min^{-1}) determinados para as estirpes wt, *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol. Os resultados do consumo de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}$) correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências independentes considerando as OD/mL medidas no início de cada ensaio (variável entre experiências). As constantes de consumo, k (min^{-1}), foram calculadas com base nos consumos de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}$) considerando 0,15 $\text{OD}_{600}/\text{mL}$ como densidade celular representativa de todos os ensaios. * $p < 0,05$ vs wt. ** $p < 0,05$ vs wt. *** $p < 0,04$ vs *ITR1-GFP*.

	<i>ITR1-GFP</i>	<i>ITR2-GFP</i>	<i>ITR1-GFP</i> sem inositol	wt
k (min^{-1})	0,047 **	0,044	0,041 ***	0,040
Consumo de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}$)	$0,097 \pm 0,006$ *	$0,086 \pm 0,004$	$0,082 \pm 0,001$	$0,081 \pm 0,002$
nº de ensaios (n)	5	6	4	3

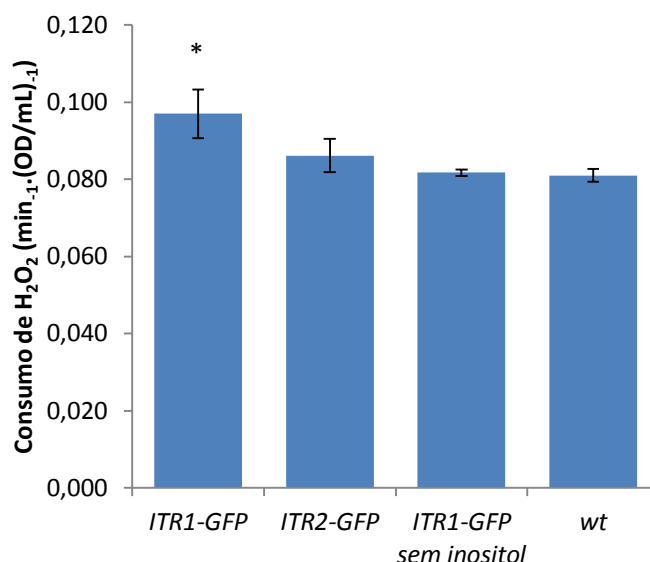


Figura 3 – Representação dos valores de consumo de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}$) para as estirpes wt, *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* crescidas em meio SC e *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol. Os resultados do consumo de H_2O_2 ($\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}$) correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. * $p < 0,05$ vs wt.

Este aumento de velocidade da estirpe *ITR1-GFP* não estava de acordo com o previsto pois a inserção integrativa da região codificante da GFP no gene *ITR1* não deveria ter qualquer impacto no metabolismo das células pelo que o consumo de H_2O_2 deveria ser semelhante ao da estirpe wt. Uma explicação possível é que a GFP possa eventualmente alterar a actividade da proteína codificada pelo gene *ITR1-GFP* (Itr1-

GFPp) levando a modificações no metabolismo lipídico derivado da alteração da concentração de inositol e, consequentemente, na permeabilidade membranar ao H_2O_2 . Já no caso da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol observou-se que o consumo de H_2O_2 decrescia em relação à *ITR1-GFP* crescida em meio SC. Esta observação era expectável pois a ausência de inositol exógeno afecta o metabolismo celular, o que pode levar a alterações da composição lipídica e, consequentemente, alteração na permeabilidade da membrana plasmática ao H_2O_2 .

IV.2.2 Cálculo dos volumes de glucose oxidase e H_2O_2 para estabelecer o estado estacionário de H_2O_2

A partir da determinação experimental do consumo de H_2O_2 e do valor de actividade específica do glucose oxidase, foram determinados os volumes de glucose oxidase a adicionar às culturas de modo a balançar o consumo de H_2O_2 pelas células, estabelecendo-se assim o estado estacionário de H_2O_2 para as estirpes em estudo. Os volumes de glucose oxidase foram determinados a partir do cálculo do consumo de H_2O_2 pelas células como descrito no ponto **III.3.**

IV.3. Determinação dos níveis membranares e totais dos transportadores de inositol (Itr1-GFPp e Itr2-GFPp) por *Western Blot*

Já foi observado em células de *S. cerevisiae* a diminuição do conteúdo de inositol nas células durante a adaptação a H_2O_2 através de um método espectrofométrico (Cepeda 2010). A autora sujeitou as células a condições de adaptação a H_2O_2 semelhantes às utilizadas no presente trabalho (150 μ M de H_2O_2 durante 5-10 min), tendo observado que os níveis de inositol diminuem drasticamente durante o tempo de adaptação a H_2O_2 .

Esta diminuição do conteúdo de inositol nas células pode resultar de uma diminuição da síntese *de novo* e/ou diminuição do transporte do inositol exógeno

através dos respectivos transportadores. Assim, o objectivo desta etapa do trabalho era determinar a existência ou não de uma alteração nos níveis dos transportadores de inositol Itr1p e Itr2p, tanto na membrana como no total da célula, durante o tempo de adaptação a H_2O_2 , que seja a causa desta diminuição dos níveis de inositol. Para este efeito as células foram sujeitas a condições de adaptação ao H_2O_2 (150 μM de H_2O_2 em estado estacionário até 20 min) e recolhidas amostras a vários tempos (controlo, 5, 10 e 20 min). As células cresceram sempre na presença de 11 μM de inositol exógeno.

Uma vez estabelecidas as condições para a preparação das culturas com H_2O_2 150 μM em estado estacionário realizou-se a adaptação das várias estirpes em estudo, *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP*, e recolheram-se amostras o longo do tempo (5 min, 10 min e 20 min).

Para a quantificação dos transportadores de inositol, Itr1-GFPp e Itr2-GFPp, foi utilizado o método de *Western Blot*. Para esse efeito foram preparados extractos membranares e extractos celulares totais, os quais foram submetidos a uma separação proteica por SDS-PAGE. Os géis contendo as proteínas separadas electroforeticamente foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau S. Estas membranas foram posteriormente sujeitas a imunodeteção recorrendo a anticorpos específicos.

De forma a quantificar a fluorescência relativa das bandas equivalentes às várias amostras recolhidas, utilizou-se o programa ImageJ nas imagens obtidas por *Western Blot*, o que possibilitou uma quantificação dos pixéis correspondentes a cada banda e, assim, uma quantificação relativa das mesmas. A quantificação foi sempre normalizada ao Ponceau S, para a correcção da quantidade de proteína aplicada. Para cada ensaio foi recolhida uma amostra controlo da cultura, tomando o valor de fluorescência dessa amostra o carácter de referência com o qual se comparou os valores de cada amostra recolhida. Nas Figuras 4A a 4D estão representados os resultados da análise por *Western Blot* dos extractos proteicos da estirpe *ITR1-GFP*. Para esta estirpe foi possível observar um aumento da quantidade da proteína Itr1-GFPp codificada por este gene na fracção membrana (Figuras 4A e 4B) e uma manutenção dos níveis desta proteína no conteúdo proteico total da célula (Figuras 4C e 4D) ao longo do tempo. Durante o tempo de adaptação foi possível observar que, apesar dos níveis totais se manterem constantes ao longo do tempo (Figuras 4C e 4D) os níveis da proteína Itr1-GFPp na

fracção membranar aumentam ao longo do tempo até cerca de 150%, aos 20 min de tratamento com H_2O_2 , relativamente aos valores das amostras controlo (Figuras 4A e 4B). Estes resultados indicam que a proteína Itr1-GFPp se acumula na fracção membranar ao longo dos 20 min de adaptação ao H_2O_2 .

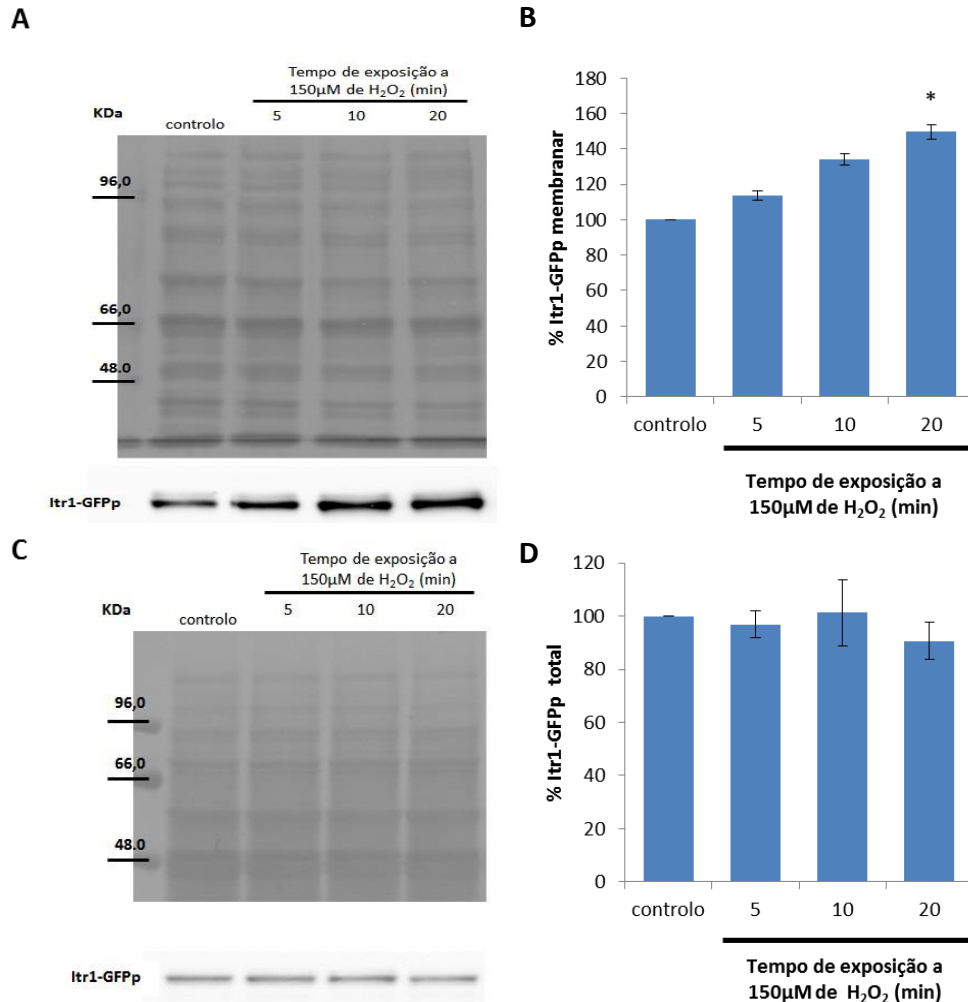


Figura 4 – Níveis da proteína Itr1-GFPp na fracção membranar (A e B) e na fracção proteica celular total (C e D) em células *S. cerevisiae* expostas a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante tempos diferentes (5, 10 e 20 min). (A) – Foram preparados os extractos membranares e analisados cerca de 40 μg de proteína de cada amostra num gel SDS-PAGE (8% (m/v)). Os níveis de Itr1-GFPp foram calculados por *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-GFP (diluição 1/1000). Na parte superior encontra-se uma membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S que foi utilizada para o controlo da aplicação dos extractos, enquanto na parte inferior se apresentam os resultados da ligação ao anticorpo. (C) – Foram preparados os extractos proteicos celulares totais e analisados cerca de 10 μL de cada amostra num gel SDS-PAGE (8% (m/v)). Os níveis de Itr1-GFPp foram calculados por *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-GFP (diluição 1/1000). Na parte superior encontra-se uma membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S que foi utilizada para o controlo da aplicação dos extractos enquanto na parte inferior se apresentam os resultados da ligação ao anticorpo. (B e D) – À direita encontra-se a representação gráfica da quantificação da fluorescência da Itr1-GFPp, normalizados ao Ponceau S. Estes ensaios correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes. * $p < 0,05$ vs controlo.

Dado que há uma acumulação da Itr1-GFPp na fracção membranar com a manutenção dos níveis da proteína na fracção total e que nas mesmas condições de adaptação de células *S. cerevisiae* há uma diminuição drástica do conteúdo de inositol celular (Cepeda 2010), é de supor que o Itr1-GFPp não está a transportar o inositol do meio exterior para o interior da célula, apesar de estar em maior quantidade na membrana plasmática. A acumulação de Itr1-GFPp na membrana deve-se a uma diminuição da degradação da proteína, como foi visto por Lai e colaboradores (Lai 1995). No entanto, o *uptake* de inositol é independente do processo de internalização da Itr1-GFPp por endocitose (Lai 1995), o que sugere que possa haver uma modificação na proteína, durante o processo de adaptação ao H₂O₂, que causa uma perda de actividade de transporte do inositol.

No caso da proteína Itr2-GFPp, o outro transportador de inositol na levedura *S. cerevisiae*, realizou-se um procedimento semelhante ao descrito acima mas em células da estirpe *ITR2-GFP*. Neste caso foi possível observar que o conteúdo da proteína Itr2-GFPp se mantém inalterado tanto na fracção membranar (Figuras 5A e 5B) como no extracto equivalente às proteínas celulares totais (Figuras 5C e 5D). Estes resultados permitem concluir que os níveis de Itr2-GFPp não são regulados pelo H₂O₂ ou por algum sinal despoletado por este.

Por comparação das intensidades de fluorescência das bandas de Itr1-GFPp e Itr2-GFPp obtidas após análise de 40 µg e 100 µg da fracção membranar de Itr1-GFP e Itr2-GFP, respectivamente, e sabendo que o tempo necessário à revelação da banda de Itr2-GFPp foi muito maior que o necessário à revelação da banda Itr1-GFPp (em média 3 min para Itr1-GFPp e 30 min para Itr2-GFPp), podemos afirmar que a Itr1-GFPp existe na célula em muito maior quantidade que a Itr2-GFPp. Foi observado por Miyashita e colaboradores, através de estudos de mutagénese, que a disrupção no gene *ITR1* diminui drasticamente o transporte de inositol extracelular. No entanto, a disrupção do gene *ITR2* não afectou o transporte de inositol de uma forma significativa (Miyashita 2003). Assim, os resultados por nós obtidos estão de acordo com os obtidos por Miyashita e colaboradores (Miyashita 2003), na medida em que o Itr1-GFPp é o principal transportador de inositol celular.

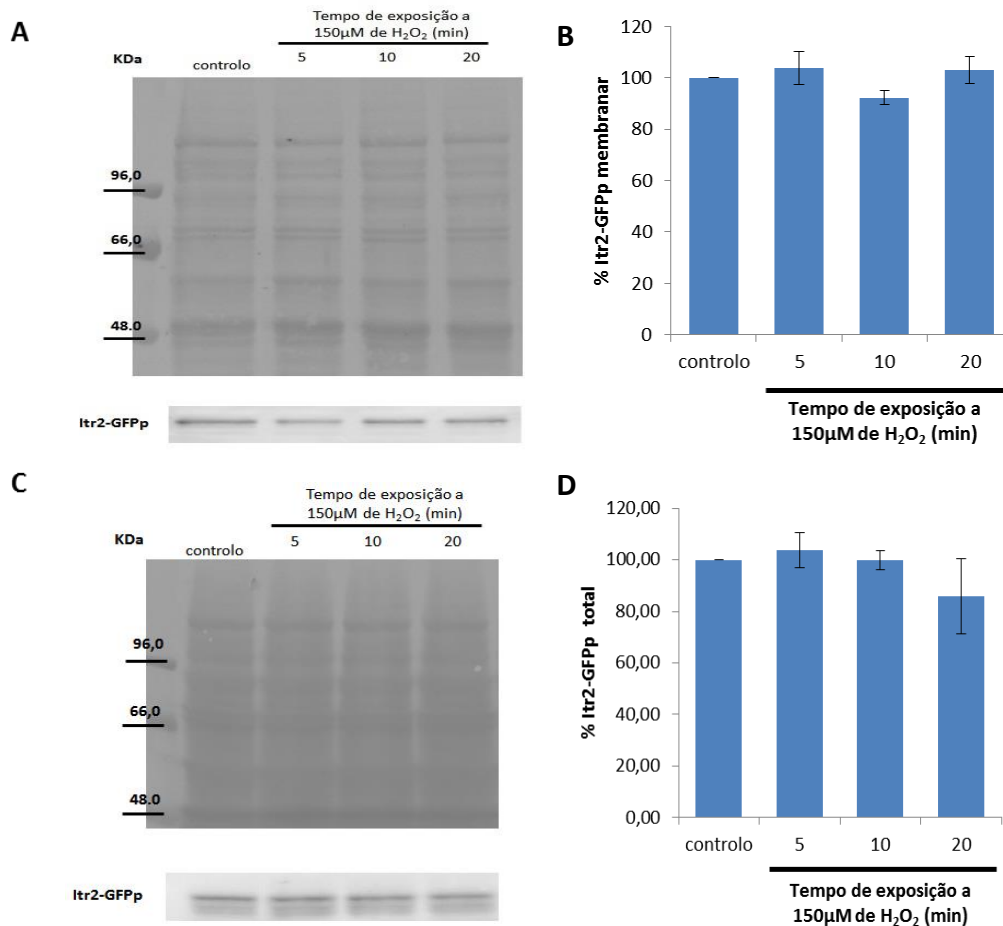


Figura 5 – Níveis da proteína Itr2-GFPp na fracção membrana (A e B) e na fracção proteica celular total (C e D) em células *S. cerevisiae* expostas a 150 μM de H₂O₂ em estado estacionário durante tempos diferentes (5, 10 e 20 min). (A) – Foram preparados os extractos membranares e analisados cerca de 100 μg de proteína de cada amostra num gel SDS-PAGE (8% (m/v)). Os níveis de Itr2-GFPp foram calculados por *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-GFP (diluição 1/750). Na parte superior encontra-se uma membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S que foi utilizada para o controlo da aplicação dos extractos enquanto na parte inferior se apresentam os resultados da ligação ao anticorpo. (C) – Foram preparados os extractos proteicos celulares totais e analisados cerca de 40 μL de cada amostra num gel SDS-PAGE (8% (m/v)). Os níveis de Itr2-GFPp foram calculados por *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-GFP (diluição 1/750). Na parte superior encontra-se uma membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S que foi utilizada para o controlo da aplicação dos extractos enquanto na parte inferior se apresentam os resultados da ligação ao anticorpo. (B e D) – À direita encontra-se a representação gráfica da quantificação da fluorescência da Itr2-GFPp, normalizados ao Ponceau S. Estes ensaios correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

É importante salientar que o método usado não aparenta ter uma sensibilidade muito elevada para concentrações pequenas de proteína. Torna-se necessário desenvolver uma metodologia que permita amplificar o sinal fluorescente emitido através da análise por *Western Blot* de modo a poder haver mais confiança nas quantificações obtidas quando as concentrações de proteína são muito pequenas, como é o caso da Itr2-GFPp.

IV.4. Determinação da localização celular dos transportadores de inositol por microscopia de fluorescência

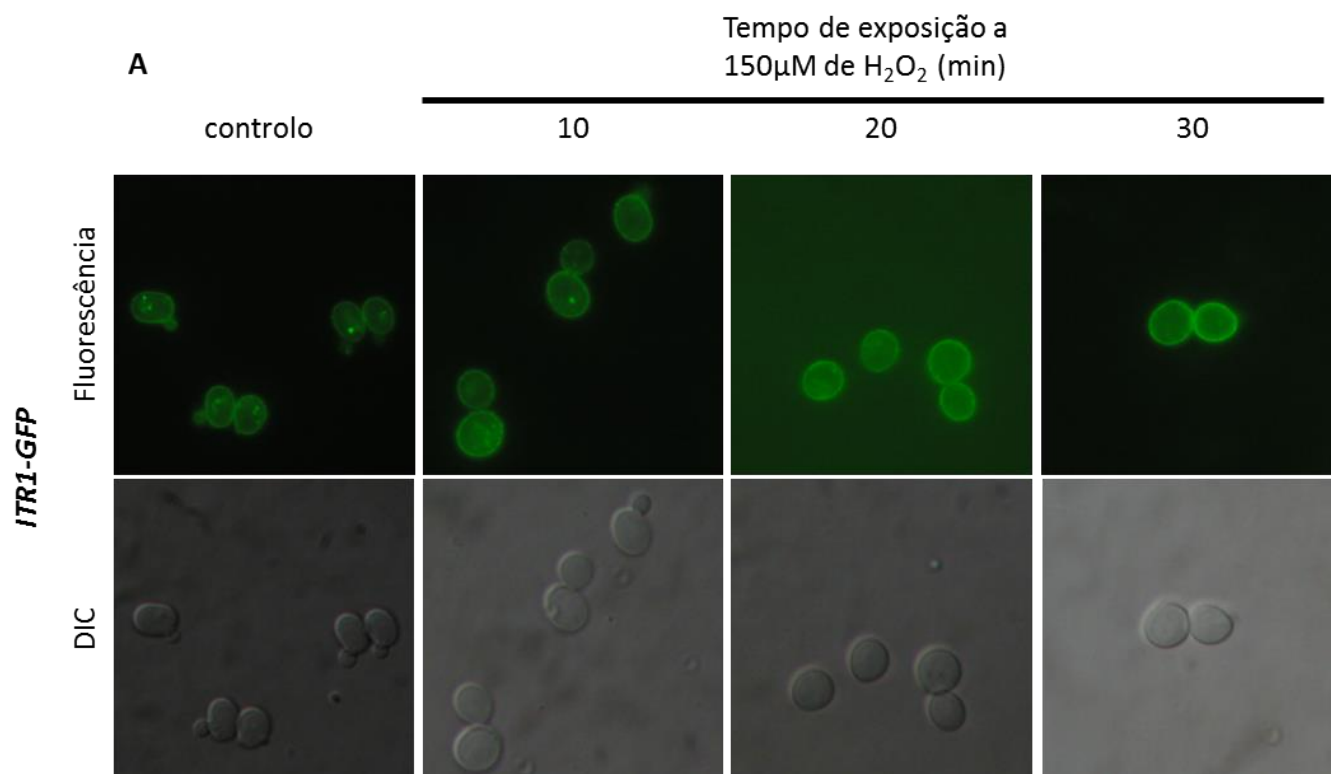
Tendo em conta que os resultados anteriores indicam que existe um aumento dos níveis de Itr1-GFP na fracção membranar das leveduras e uma manutenção do seu conteúdo total celular, torna-se relevante a visualização da acumulação membranar de Itr1-GFP com uma equivalente diminuição da internalização da proteína, de modo a podermos confirmar os resultados obtidos. Assim, procedeu-se à determinação da localização celular dos transportadores de inositol utilizando o método de microscopia de fluorescência. Através deste método é possível visualizar na célula a localização das proteínas marcadas com GFP pela emissão de uma luz UV sobre a amostra em estudo.

Uma vez estabelecidas as condições de adição de 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, realizou-se a adaptação da estirpe *ITR1-GFP* e recolheram-se amostras a vários tempos durante a adaptação (10 min, 20 min e 30 min) tal como descrito no ponto **III.3.5.2**, até ao ponto de recolha das células.

Relativamente à estirpe *ITR2-GFP* não foi possível determinar a localização celular da Itr2-GFP nas células por microscopia de fluorescência, resultado do seu menor conteúdo nas células.

Recorrendo a microscopia de fluorescência procedeu-se à visualização das proteínas Itr1-GFP antes da adição de H_2O_2 (controlo) e em múltiplos tempos após a adição de 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário. Na Figura 6A encontram-se as imagens obtidas por microscopia de fluorescência e por contraste de interferência artificial (DIC, do inglês *Differential Interference Contrast*) nas condições anteriores.

Para efeitos de quantificação do Itr1-GFP internalizado foram contadas as células que apresentassem internalização da Itr1-GFP e calculada a percentagem em relação às células totais da imagem. Assim, no caso da estirpe *ITR1-GFP*, foi possível observar uma diminuição da percentagem de células com a Itr1-GFP internalizada ao longo do tratamento com H_2O_2 , ao que corresponde uma acumulação da proteína na membrana plasmática da célula (Figuras 6A e 6B e Quadro 3).



B

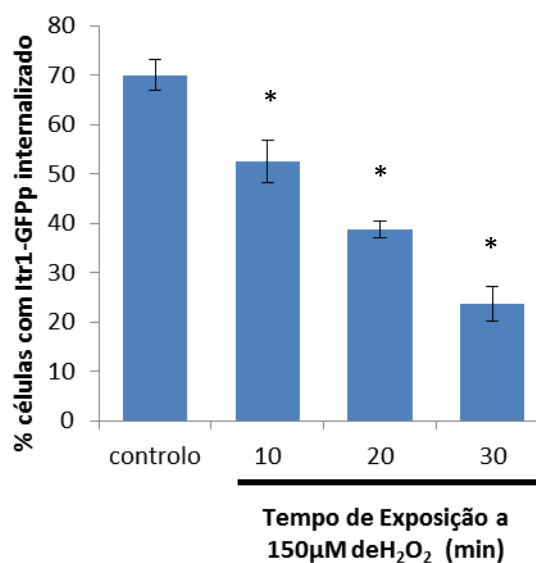


Figura 6 – Microscopia de fluorescência e DIC das células da estirpe *ITR1-GFP* controle e expostas a 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário e representação gráfica dos valores de percentagem de internalização da Itr1-GFPp. (A) – Imagens de microscopia de fluorescência (fotografadas com uma abertura de 2.8 e tempo de exposição de 1/1,3 s) e imagens de DIC (fotografadas com uma abertura de 2.8 e tempo de exposição de 1/10 s) durante os vários tempos de adaptação com 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário. (B) – Representação gráfica dos valores de percentagem de internalização da Itr1-GFPp. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes com contagem de pelo menos cinquenta células por experiência. * $p < 0,001$ vs controle.

Quadro 3 - Valores de percentagem de internalização da Itr1-GFPp em células controlo e células tratadas com 150 μ M de H₂O₂ em estado estacionário. Valores de percentagem de internalização da Itr1-GFPp obtidas após análise das imagens de microscopia de fluorescência. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos quatro experiências independentes com contagem de pelo menos cinquenta células por experiência. * $p < 0,001$ vs controlo.

		% células com Itr1-GFPp internalizado
	Controlo	70,0 \pm 3,10
Tempo de exposição a 150μM de H₂O₂ (min)	5	52,5 \pm 4,39 *
	10	38,8 \pm 1,78 *
	20	23,8 \pm 3,49 *

Como já foi referido, a acumulação da proteína na membrana é devida à inibição da sua degradação (Lai 1995). Como se pode observar nas imagens de microscopia de fluorescência obtidas (Figura 6A), a Itr1-GFPp acumula-se na membrana, não sendo portanto internalizada. Esta observação confirma os resultados obtidos durante a determinação do conteúdo membranar e total da proteína Itr1-GFPp, pois existe um aumento do conteúdo da proteína na membrana sem que seja alterado o seu conteúdo celular total (Figura 4B).

De modo a confirmar que a fluorescência que se visualiza no citoplasma corresponde ao transportador Itr1-GFPp internalizado realizou-se um procedimento semelhante ao anterior com a estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol. Como já foi referido, o inositol é um importante regulador do elemento UAS_{INO} que está presente no gene *ITR1-GFP*. A ausência de inositol exógeno leva a uma regulação negativa da degradação da Itr1 (Lai 1995) de onde resulta a acumulação de Itr1-GFPp na membrana. Então, quando a estirpe em estudo cresce sem inositol exógeno espera-se observar uma acumulação da proteína Itr1-GFPp. Na Figura 7 encontram-se os resultados obtidos nessa observação, que correspondem ao esperado, pois apenas se visualiza a Itr1-GFPp na membrana plasmática das células, não ocorrendo qualquer internalização da proteína. Estes resultados indiciam que os pontos fluorescentes observados na estirpe *ITR1-GFP* (Figura 6) correspondem efectivamente à proteína Itr1-GFPp internalizada e que o inositol exógeno é necessário para que haja internalização e subsequente degradação da Itr1-GFPp. No entanto estes resultados não estão de acordo com os resultados apresentados por Miyashita e colaboradores (Miyashita 2003). O trabalho realizado por estes investigadores envolveu a utilização de uma estirpe

transformada com um plasmídeo multicópia contendo a região codificante do gene *ITR1-GFP* e o promotor ADH1, não contendo as regiões de regulação por inositol. Este promotor leva a uma expressão elevada das sequências por ele afectadas (Ammerer 1983) de onde resulta um nível de expressão da proteína que não corresponde aos níveis encontrados no modelo fisiológico. De facto, a estirpe utilizada no presente trabalho contém a região codificante da proteína GFP integrado na sequência *ITR1* genómica da levedura, estando o gene de fusão *ITR1-GFP* sob regulação dos elementos reguladores do *ITR1* selvagem. Desta forma, nas nossas condições experimentais, tanto a regulação como os níveis de expressão da proteína Itr1-GFPp são mais aproximados do modelo fisiológico do que a estirpe utilizada por Miyashita e colaboradores (Miyashita 2003).

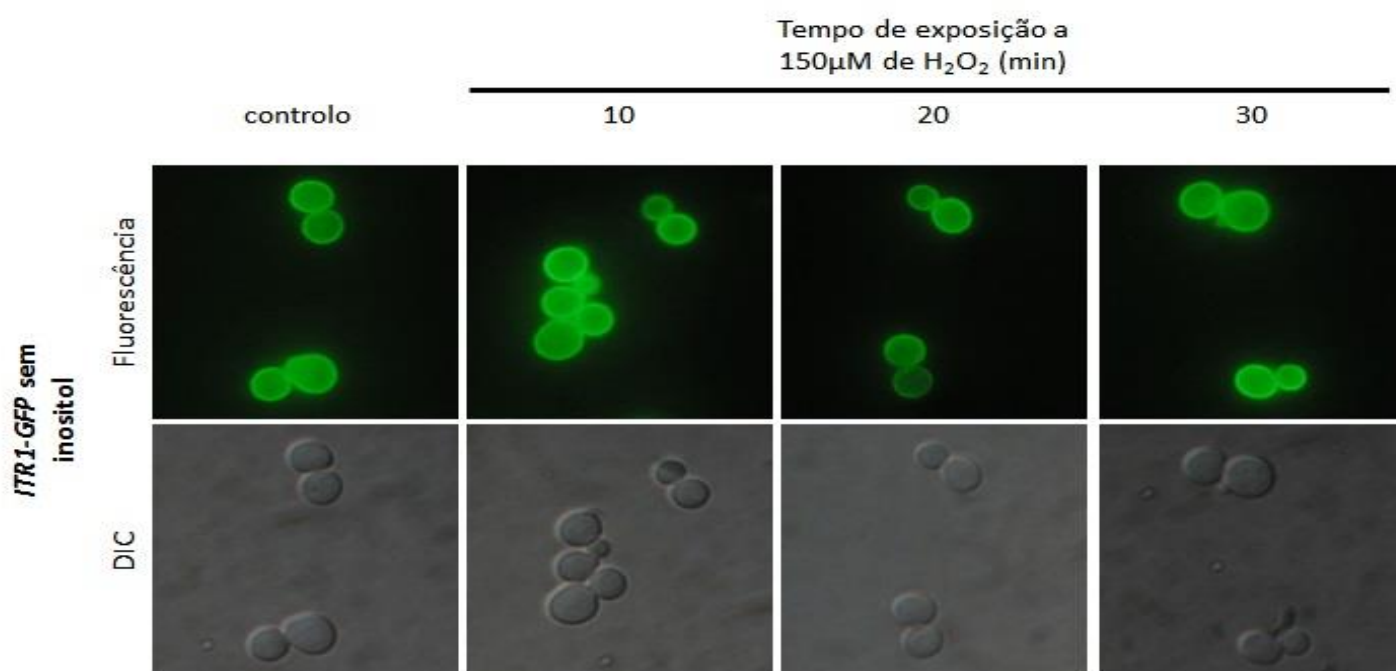


Figura 7 – Microscopia de fluorescência e DIC de células da estirpe *ITR1-GFP* controlo e expostas a 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário. Imagens de microscopia de fluorescência (fotografadas com uma abertura de 2.8 e tempo de exposição de 1/1,3 s) e DIC (fotografadas com uma abertura de 2.8 e tempo de exposição de 1/10 s) durante os vários tempos de adaptação com 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário.

Tal como podemos observar na Figura 7, as imagens obtidas para a estirpe *ITR1-GFP* crescidas em meio SC sem inositol apresentavam uma saturação de fluorescência, nas mesmas condições de observação no microscópio de fluorescência que as utilizadas para a obtenção das imagens da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC. Esta saturação de fluorescência poderia mascarar a existência de pontos fluorescentes no interior da célula, correspondentes à proteína Itr1-GFPp internalizada. Desta forma, para confirmar

que não existe internalização da Itr1-GFP na estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol, obtiveram-se imagens com vários tempos de exposição de modo a perceber se existia alguma internalização mascarada. Observou-se que mesmo mudando os tempos de exposição na obtenção das imagens, não existia nenhuma internalização da Itr1-GFP (Figura 8). Da análise dos resultados anteriores, pode-se concluir que 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário vão induzir a acumulação de Itr1-GFP na membrana plasmática, devido à inibição da sua internalização.

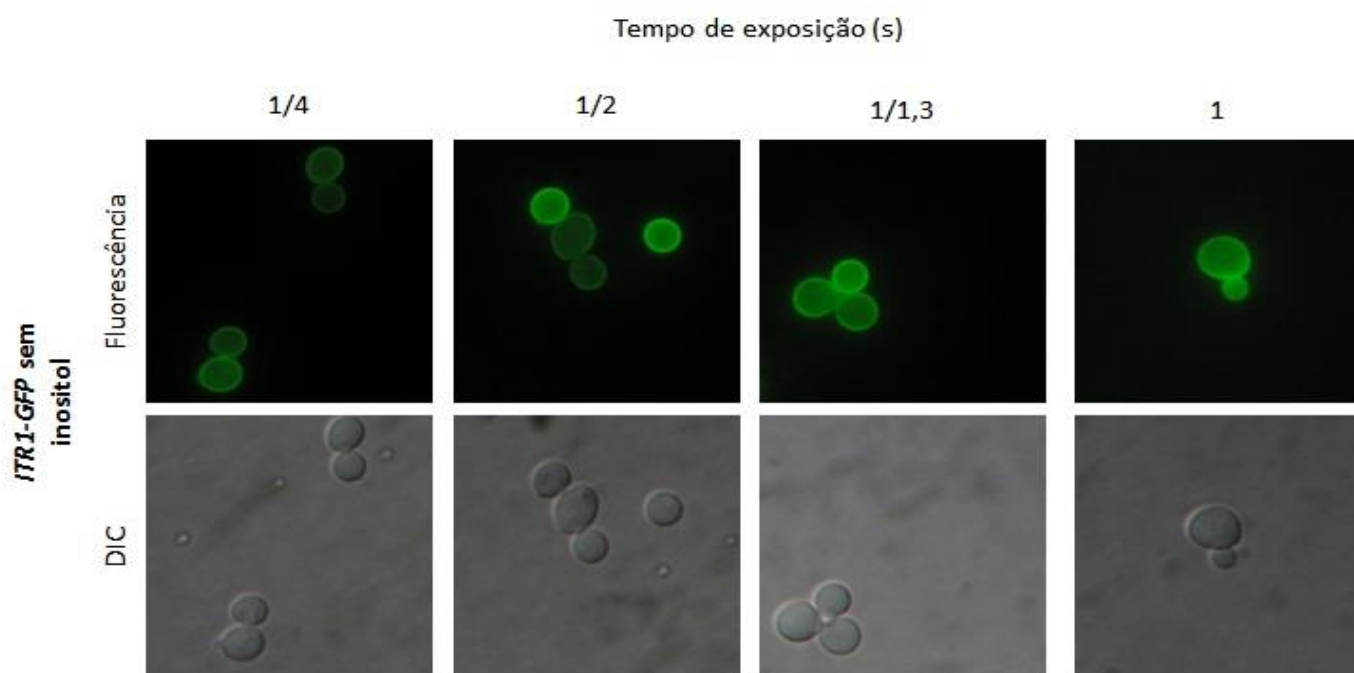


Figura 8 –Microscopia de fluorescência e DIC de células da estirpe *ITR1-GFP* crescida em meio SC sem inositol obtidas a vários tempos de exposição. Imagens de microscopia de fluorescência (fotografadas com uma abertura de 2.8 e tempos de exposição de 1/4, 1/2, 1/1.3 e 1 s) e DIC (fotografadas com uma abertura de 2.8 e tempo de exposição de 1/10 s).

Tal como foi visto por Lai e colaboradores (Lai 1995), a acumulação da Itr1-GFP na membrana plasmática é devida a uma diminuição da degradação da proteína Itr1-GFP, resultante da diminuição da sua internalização. No entanto, o mecanismo pelo qual a diminuição da degradação da Itr1-GFP induzido pelo H_2O_2 é alterado, é ainda desconhecido. Assim, podem colocar-se várias hipóteses que expliquem este fenómeno, podendo estas ocorrer em simultâneo ou não: (1) – a presença de

concentrações sub-letais de H_2O_2 oxida a Itr1-GFPp, podendo modificar a conformação da proteína, não permitindo que esta se ligue à sua proteína adaptadora para ubiquitinação, a Art5p e, conseqüentemente, a Itr1-GFPp não é degradada; (2) a presença de concentrações sub-letais de H_2O_2 modifica a conformação da proteína Art5p impedindo-a de se ligar à Itr1-GFPp e/ou ao ligase de ubiquitina Rsp5p e, assim, neutralizando a sua função; (3) a presença de concentrações sub-letais de H_2O_2 impede a activação da Art5p por modificações pós-traducionais, neutralizando a sua função (Pereira 2014).

Assim, no sentido de tentar esclarecer o mecanismo anterior, foi-se determinar se a presença de concentrações sub-letais de H_2O_2 modifica a conformação do transportador Itr1-GFPp pela oxidação das cisteínas presentes nesta proteína.

IV.5. Determinação dos níveis de oxidação do transportador de inositol Itr1-GFPp

Uma vez realizada a quantificação dos transportadores de inositol das estirpes *ITR1-GFP* e *ITR2-GFP* (Itr1-GFPp e Itr2-GFPp, respectivamente) e determinada a localização celular da proteína Itr1-GFPp em células tratadas com 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário, foi-se determinar qual o nível de oxidação da proteína Itr1-GFPp durante os vários tempos de tratamento. Tal como se viu anteriormente, a oxidação da proteína Itr1-GFPp pode ser uma das causas da acumulação desta proteína na membrana plasmática. Para se determinar se o H_2O_2 vai oxidar algumas das cisteínas da proteína Itr1-GFPp, foi utilizado um método em que se utiliza um composto, o maleimida metoxipolietilenoglicol (MAL-PEG), que se liga às cisteínas reduzidas e posteriormente se analisa por SDS-PAGE, tal como indicado no esquema da Figura 9. Através da diferença da mobilidade electroforética das proteínas ligadas e não ligadas com o MAL-PEG e posterior análise por *Western Blot* é possível perceber o grau de oxidação das cisteínas da proteína Itr1-GFPp (Figura 9).

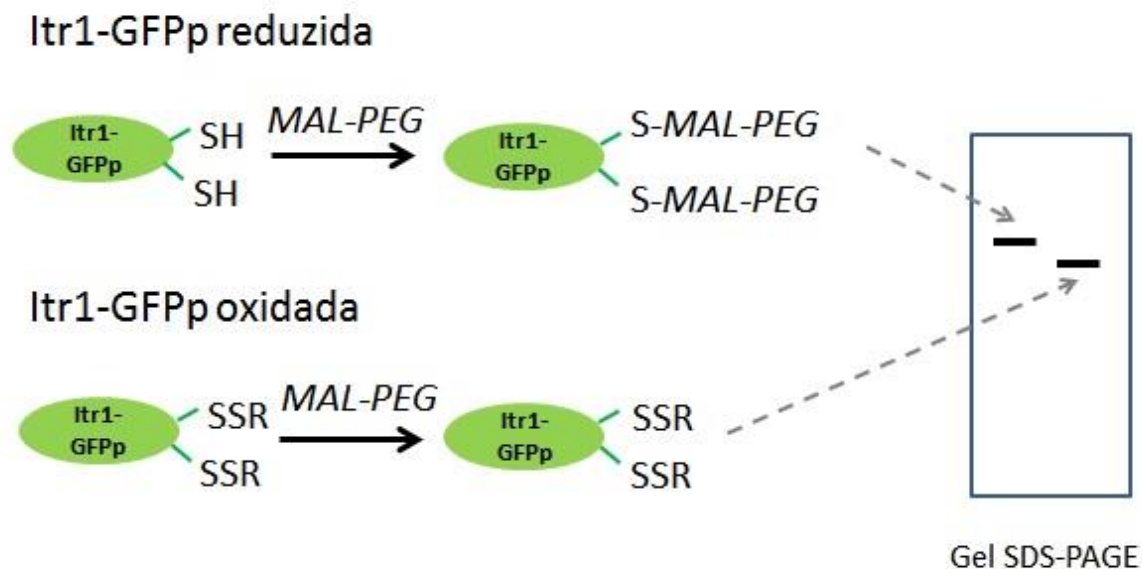


Figura 9 – Esquema do mecanismo de acção do maleimida metoxipolietilenoglicol (MAL-PEG) por ligação a cisteínas reduzidas. A ligação do MAL-PEG diminui a mobilidade electroforética das proteínas permitindo a sua identificação após separação num gel de SDS-PAGE.

Quando existe oxidação das cisteínas da proteína Itr1-GFPp, durante a adaptação com H_2O_2 , não irá haver ligação do MAL-PEG a estas cisteínas. Assim a mobilidade electroforética destas proteínas é alterada. Quanto menor o grau de oxidação das cisteínas da proteína Itr1-GFPp menor será a sua migração no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os extractos proteicos preparados com TCA de acordo com o procedimento descrito em **III.3.7.** foram preparados a partir de células adaptadas com $150\ \mu M$ de H_2O_2 e foram sujeitos a uma reacção com o MAL-PEG, separadas por SDS-PAGE e visualizada a diferença na migração da proteína Itr1-GFPp por *Western Blot*. Para haver a reacção do MAL-PEG com os extractos proteicos, foi necessário determinar a quantidade deste reagente na reacção. Foi então realizada uma titulação da quantidade de MAL-PEG a ser utilizada, usando para isso concentrações crescentes de MAL-PEG (1, 2, 3 e 4 mM). Foi escolhida a concentração de 4 mM, pois foi a concentração para a qual se obteve uma banda bem definida por *Western Blot* da Itr1-GFPp ligada ao MAL-PEG (dados não mostrados).

Na Figura 10 encontram-se os resultados da análise por *Western Blot* dos diferentes extractos proteicos após a reacção com MAL-PEG, assim como a respectiva membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S (Figura 10). Na faixa 7 foi analisado o extracto proteico sem tratamento, quer com o H_2O_2 quer com o MAL-PEG. Esta análise serve para controlo de identificação da proteína Itr1-GFPp no gel, que tal como se esperava surge na zona dos 93 KDa. Nas faixas 5 e 6 encontram-se os resultados para controlo da Itr1-GFPp totalmente oxidada e totalmente reduzida, respectivamente. Estes controlos confirmam a identificação das bandas no gel, após análise por *Western Blot*, dos dois estados de oxidação da proteína Itr1-GFPp. Tal como esperado, a proteína totalmente oxidada (faixa 5) migra na mesma posição que a proteína intacta sem reacção com MAL-PEG, enquanto a proteína totalmente reduzida apresenta uma retardação máxima na migração no gel (muito superior ao marcador de 96 KDa), devida à ligação das moléculas de MAL-PEG. Na faixa 1 da Figura 10, onde se analisa o extracto proteico após a reacção com MAL-PEG, é possível visualizar uma banda que coincide com a banda da proteína Itr1-GFPp totalmente reduzida (faixa 6). Este resultado indica que a proteína, em condições normais na célula, apresenta as suas cisteínas no estado reduzido. Nas faixas 2 a 4 apresentam-se os resultados dos extractos proteicos tratados com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, em diferentes tempos, após a reacção com o MAL-PEG. Tal como se pode observar, aparece em todas as faixas uma banda superior, que coincide com a banda da proteína totalmente reduzida. Na faixa 3, ao fim de 10 min de tratamento com o peróxido, é possível visualizar duas bandas muito ténues (bandas (a) e (b)), que poderão corresponder a moléculas de Itr1-GFPp parcialmente oxidadas em algumas cisteínas, daí que a migração não seja totalmente retardada como no caso da molécula Itr1-GFPp totalmente reduzida. É então possível que haja oxidação de algumas cisteínas induzida pelo H_2O_2 , mas que não seja em todas as moléculas, logo a intensidade das bandas é muito fraca, proporcionalmente ao número de moléculas oxidadas pelo H_2O_2 .

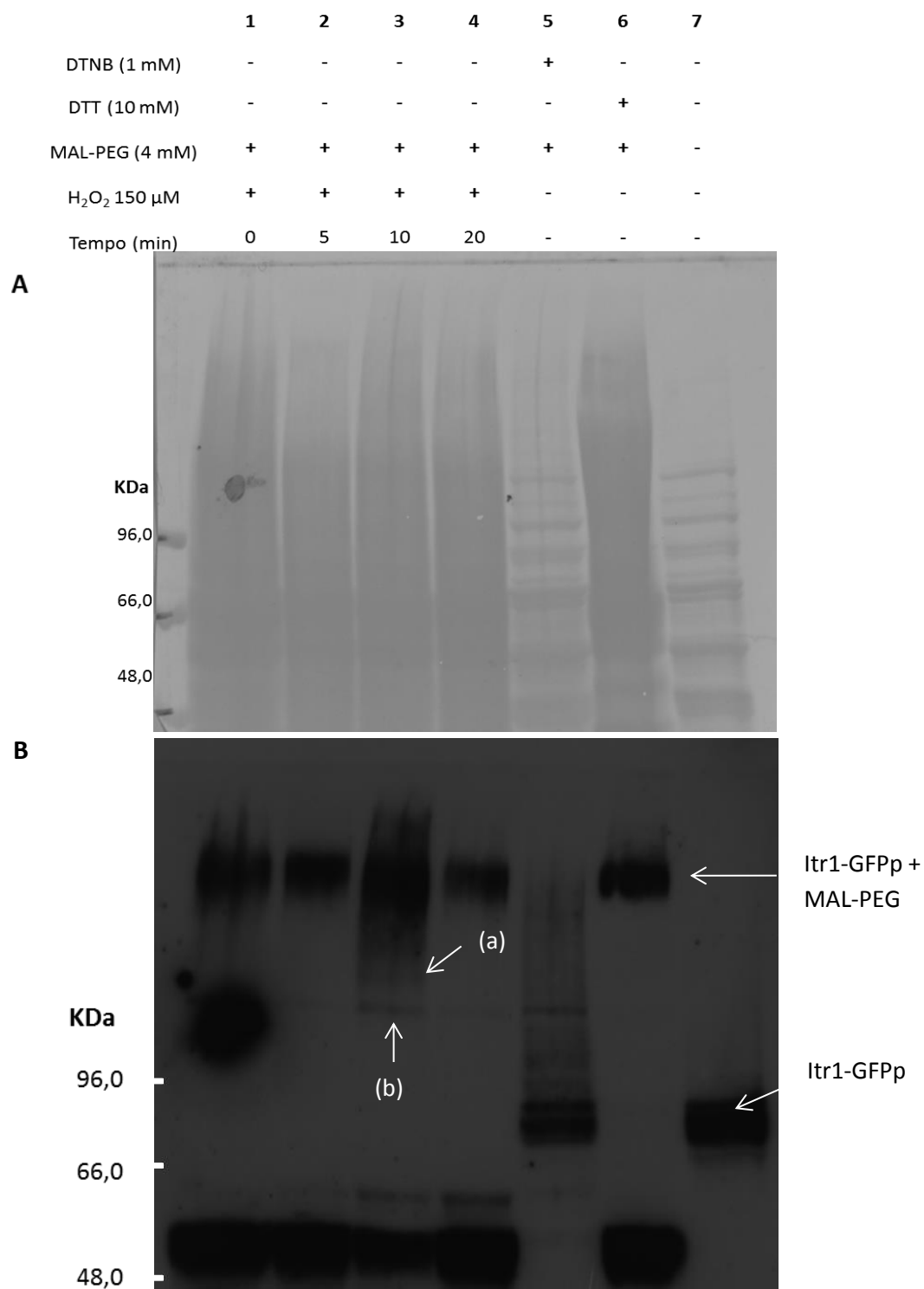


Figura 10 – Determinação dos níveis de oxidação do transportador de inositol Itr1-GFPp na ausência ou na presença de 150 μ M de H₂O₂ em estado estacionário através da reacção com MAL-PEG. (A) – Membrana de nitrocelulose, corada com Ponceau S, após separação das proteínas por SDS-PAGE das amostras e dos controlos realizados após a reacção com MAL-PEG. (B) – Resultado do *Western Blot* da membrana anterior, após ligação com o anticorpo anti-GFP. Os resultados apresentados provêm de uma única experiência efectuada nas condições descritas nos Materiais e Métodos (III.3.8.).

Na Figura 10 podemos observar, para além das bandas já discutidas, a existência de uma banda acima dos 48 KDa quando as cisteínas da proteína Itr1-GFPp se encontram reduzidas e que não aparece quando as cisteínas das Itr1-GFPp se encontram oxidadas. Isto pode dever-se à ocorrência de uma hidrólise na proteína, por um protease específico, devido à redução das cisteínas nelas presentes, levando ao surgimento de uma banda de uma proteína com menores dimensões do que o esperado. Esta banda deverá conter um conjunto entre parte da proteína e parte ou total da proteína GFP que lhe foi acoplada, visto que há ligação com o anticorpo anti-GFP.

Os resultados obtidos indiciam que as cisteínas da proteína Itr1-GFPp, na sua forma intacta e durante o tempo de tratamento com 150 μM de H_2O_2 , se encontram maioritariamente reduzidas. No entanto, o protocolo seguido para a realização deste método levanta algumas dúvidas quanto a se poder concluir que as cisteínas da proteína Itr1-GFPp, na sua forma intacta e durante o tempo de adaptação a H_2O_2 , se encontram reduzidas. A adição de 10 mM de DTT para fazer o *quenching* do MAL-PEG tem um efeito redutor nas cisteínas oxidadas. No entanto, esta concentração pode não ser suficiente para impedir a ligação do MAL-PEG a estas cisteínas reduzidas pelo DTT, uma vez que Xiao e colaboradores utilizaram uma concentração de DTT maior (50 mM) que a utilizada neste trabalho (Xiao 2004). Uma vez que a adição de DTT 10 mM pode não incapacitar o MAL-PEG de reagir com cisteínas reduzidas, o MAL-PEG pode continuar a reagir com as cisteínas reduzidas pelo DTT, mascarando qualquer cisteína oxidada que existisse na proteína inicialmente. Desta forma pareceria que as cisteínas da proteína Itr1-GFPp se encontram completamente reduzidas quando na verdade podem não estar. Assim é necessário utilizar outro método ou alterar o presente método de modo a que seja possível determinar o grau de oxidação das cisteínas da proteína Itr1-GFPp. Uma alteração possível a este método é a não-adição de DTT nas amostras, comparando com amostras contendo DTT, e removendo o MAL-PEG da solução após a reacção, de modo a se poder observar a existência ou não de cisteínas reduzidas.

O facto de aparecerem duas bandas muito ténues ao fim de 10 min de tratamento, também indica que esta metodologia tem uma fraca sensibilidade para situações em que a oxidação de uma cisteína não acontece em todas as proteínas presentes. Neste ponto, com os dados obtidos e utilizando esta metodologia do MAL-PEG, não é possível concluir de um modo absoluto que o H_2O_2 está a induzir a oxidação da Itr1-GFPp.

IV.6. Determinação do estado de oxidação de cada resíduo de cisteína da Itr1-GFPp por homologia e espectrometria de massa

Uma das hipóteses colocadas para a inibição da actividade da Itr1-GFP pelo H_2O_2 foi que a presença de concentrações sub-letais de H_2O_2 oxida a Itr1-GFPp, podendo modificar a conformação da proteína, não permitindo que esta se ligue à sua proteína adaptadora para ubiquitinação, a Art5p. Para se perceber quais as cisteínas que podem estar sujeitas a oxidação (se esta existir), estas foram localizadas tridimensionalmente na proteína através de modulação por homologia e observadas quais estão potencialmente expostas ao solvente. Além disso foi também determinado qual(ais) a(s) cisteína(s) que se oxida(m) através da técnica de espectrometria de massa no caso de haver oxidação. Esta técnica permite observar quais as cisteínas que estão ligadas ao NEM e portanto, não oxidadas. Dessa observação podemos concluir quais as cisteínas que se encontram oxidadas na proteína pela acção de $150\text{ }\mu\text{M}$ de H_2O_2 em estado estacionário.

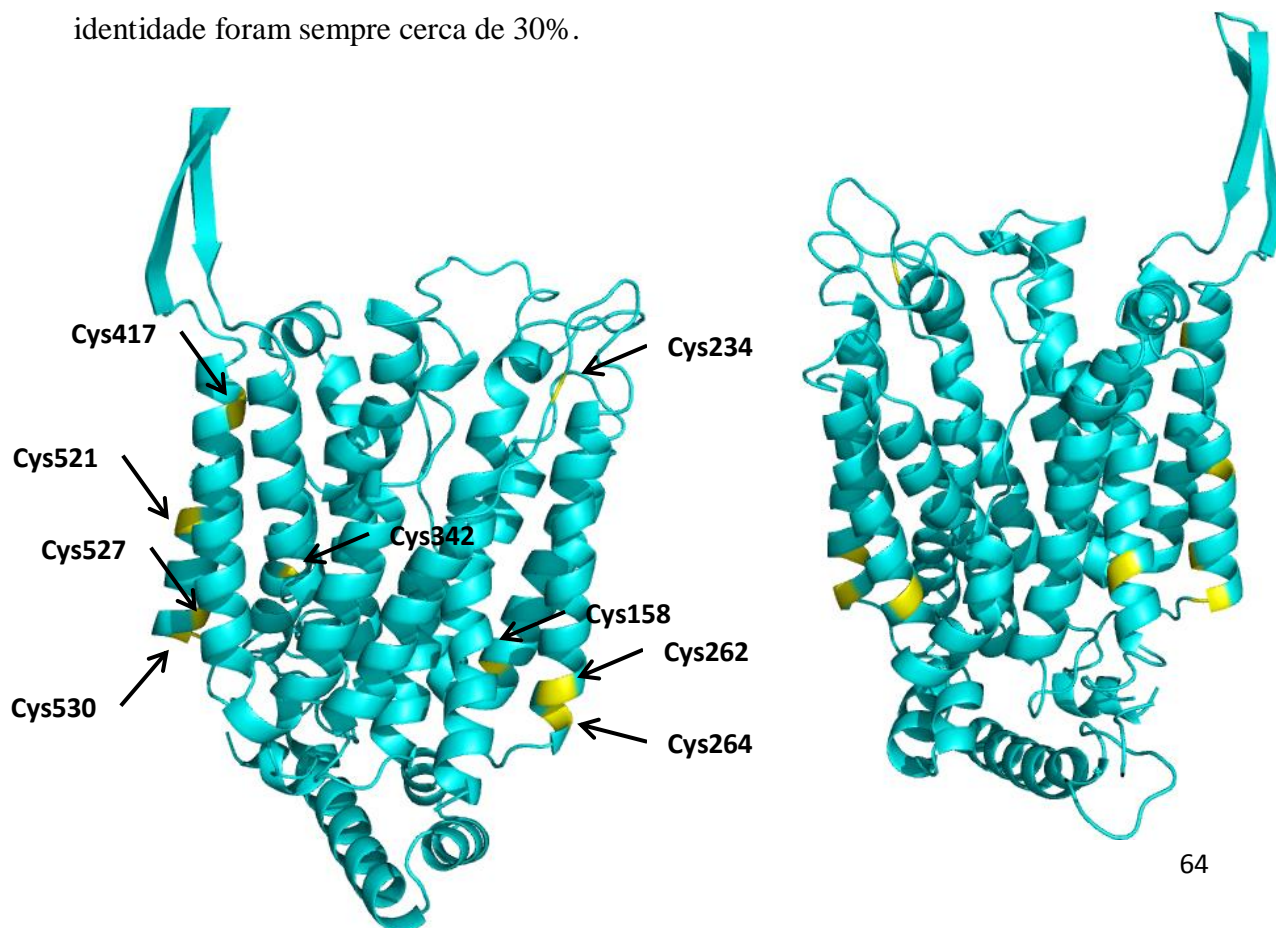
IV.6.1. Determinação da estrutura tridimensional da Itr1-GFPp através de modelação por homologia

A Itr1-GFPp possui na sua sequência, como já foi referido, nove cisteínas, como se pode observar na Figura 11. Para se perceber quais as cisteínas que podem estar sujeitas a oxidação (se esta existir), é necessário localizar as cisteínas tridimensionalmente na proteína e observar quais estão potencialmente expostas ao solvente. No entanto a estrutura tridimensional da Itr1p não foi ainda determinada nem por NMR nem por cristalografia de raios X. Foi então necessário recorrer à técnica de modelação por homologia para obtermos uma estimativa da estrutura tridimensional onde possamos observar a localização relativa das cisteínas na proteína.

MGIHIPYLTS	KTSQSNVGDA	VGNADSVFEN	SEHDSPSKRG	KITLESHEIQ	50
RAPASDDEDR	IQIKPVNDED	DTSMITFNQ	SLSPFIITLT	FVASISGFMF	100
GYDTGYISSA	LISIGTDLDH	KVLTGEKEI	VTAATSLGAL	ITSIFAGTAA	150
DIFGRKRCLM	GSNLMFVIGA	ILQVSAHTFW	QMAVGRLIMG	FGVGIGSLIA	200
PLFISEIAPK	MIRGRLTVIN	SLWLTGGQLV	AYGCAGALNY	VNNGWRILVG	250
LSLIPTAVQF	TCLCFLPDTP	RYYVMKGDIA	RATEVLKRSY	TDTSEEIER	300
KVEELVTLNQ	SIPGKNVPEK	VWNTIKELHT	VPSNLRALII	GCGLQAIQQF	350
TGWNLSMYFS	GTIFETVGFK	NSSAVSIIVS	GTNFIFTLVA	FFSIDKIGRR	400
TILLIGLPGM	TMALVVCISA	FHFLGIKFDG	AVAVVVSSGF	SSWGIVIIVF	450
IIVFAAFYAL	GIGTVPWQQS	ELFPQNVIRI	GTSYATATNW	AGSLVIASF	500
LTMLQNITPA	GTFAFFAGLS	CLSTIFYCFC	YPELSGLELE	EVQTILKDG	550
NIKASKALAK	KRKQQVARVH	ELKYEPTQEI	IEDI		584

Figura 11 – Sequência de resíduos de aminoácido da proteína Itr1p. A amarelo encontram-se assinalados os nove resíduos de cisteína presentes na sequência desta proteína (Cys158, Cys234, Cys262, Cys264, Cys 342, Cys 417, Cys521, Cys527 e Cys530).

Foram testados diferentes serviços de modelação por homologia (*Swiss-Model*, *Phyre2*, *ModWeb*, *I-Tasser* e *HHPred*) embora sem grandes diferenças nos resultados finais, pelo que optámos pelo serviço *Swiss-Model* do portal web ExPASy (<http://swissmodel.expasy.org>). Foram construídos também diferentes modelos usando diferentes proteínas como *template* e os resultados obtidos foram comparados através de alinhamentos de estruturas usando o *software* de visualização PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4* Schrödinger, LLC). Na Figura 12 podemos observar o modelo obtido através do programa *Swiss-Model*. Os *templates* escolhidos para os cálculos foram de acordo com o maior *score* obtido, sendo que os valores de identidade foram sempre cerca de 30%.



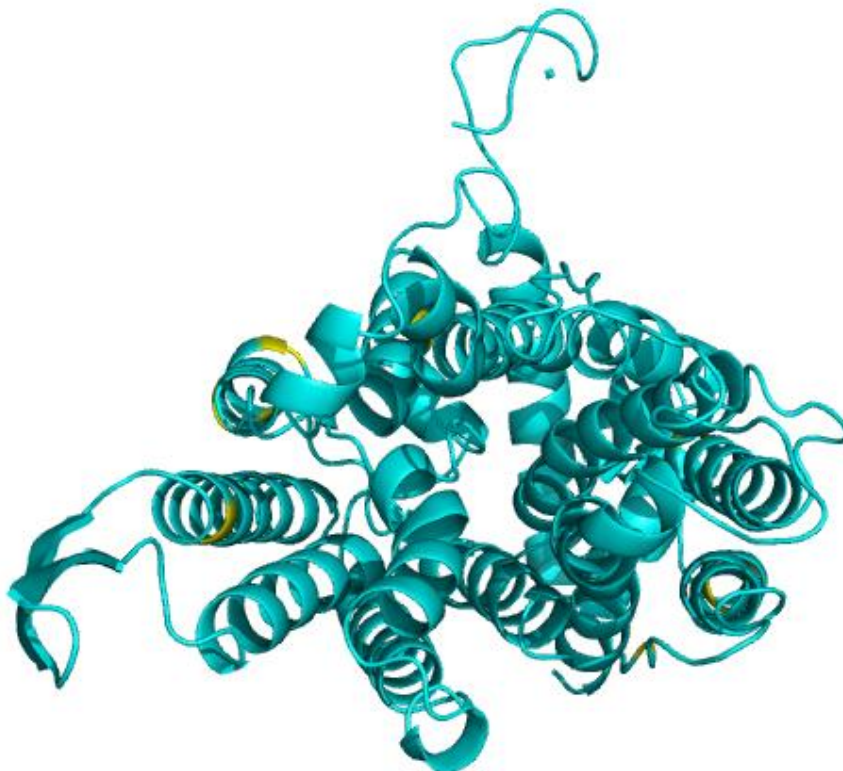


Figura 12 – Imagens de vários planos da proteína Itr1p modelada por homologia através do programa *Swiss-Model*. Foi utilizado como *template* da Itr1p a proteína XylEp de *Escherichia coli* (estirpe K12), um transportador simporte de H⁺-xilose. A amarelo estão assinalados os nove resíduos de cisteína presentes na sequência da proteína Itr1p (Cys158, Cys234, Cys262, Cys264, Cys 342, Cys 417, Cys521, Cys527 e Cys530).

A estrutura obtida apresenta uma grande semelhança estrutural na zona central da proteína, correspondendo ao domínio transmembranar. Já nas zonas citoplasmática e extracelular existem diferenças significativas devido às limitações dos métodos de modelação por homologia, que têm maior dificuldade em prever a posição de resíduos aminoácidos em zonas que não estejam nas hélices α , que constituem o *core* da proteína. No entanto, como as cisteínas estão localizadas no *core* da proteína, podemos ter alguma confiança sobre as suas posições relativamente à posição da membrana celular. Fica no entanto a dúvida em relação ao rearranjo das hélices α e às suas posições relativas já que a construção foi feita usando o rearranjo específico da proteína *template* com aproximadamente 30% de identidade, não havendo garantias que o mesmo rearranjo se mantenha no caso da Itr1p.

Observando o modelo obtido, podemos observar que oito das nove cisteínas existentes na Itr1p estão localizadas em zonas com acessibilidade ao solvente, ou seja, encontram-se em zonas mais longínquas da zona central do domínio transmembranar, que está protegida da acção do solvente pelas caudas da bicamada lipídica. A Cys521 encontra-se localizada no meio do domínio transmembranar da proteína, pelo que é

mais difícil a acção do solvente nessa zona e assim menos provável a sua modificação. Já as restantes cisteínas (Cys158, Cys234, Cys262, Cys264, Cys 342, Cys 417, Cys527 e Cys530) estão em zonas relativamente próximas do citoplasma ou da zona extracelular, pelo que estão acessíveis ao solvente e, consequentemente, passíveis de serem modificadas por acção deste. A partir destes resultados, mesmo com a incerteza associada, podemos afirmar que há cisteínas passíveis de serem oxidadas.

IV.6.2. Determinação do estado de oxidação dos resíduos de cisteína da proteína Itr1-GFPp

Após a determinação da estrutura tridimensional da proteína Itr1p através de modelação por homologia (com todas as limitações associadas à construção deste modelo), realizou-se uma imunoprecipitação da proteína Itr1-GFPp tanto na ausência (controlo) como na presença de 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min. Esta imunoprecipitação foi realizada de modo a purificar-se o máximo possível a proteína Itr1-GFPp para esta ser submetida a espectrometria de massa e, assim, ser possível observar qual o estado de oxidação dos resíduos de cisteína presentes nesta proteína. De modo a poder-se observar quais as cisteínas oxidadas foi utilizado o composto N-etilmaleimida (NEM), que se liga a cisteínas reduzidas de um modo irreversível. Assim, durante a análise por espectrometria de massa, é possível observar as variações de massa dos péptidos obtidos pela ligação do NEM e inferir qual o estado de oxidação das cisteínas.

Os extractos proteicos preparados na presença de NEM de acordo com o procedimento descrito em **III.3.9.** foram preparados a partir de células controlo e células adaptadas com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min. Estes extractos foram imunoprecipitados e separados por SDS-PAGE. Numa parte do gel obtido foi visualizada a diferença na migração da proteína Itr1-GFPp por *Western Blot* e o restante gel foi corado com uma solução de azul de Commassie R250 e retiradas algumas bandas de proteína coradas (Figura 13). Estas bandas foram então sujeitas a uma hidrólise com um enzima proteolítico, a tripsina, o produto da hidrólise foi reduzido com DTT e os péptidos foram tratados com iodoacetamida (IAM), um agente

alquilante, para análise final por espectrometria de massa. O NEM foi utilizado de modo a bloquear-se as cisteínas reduzidas pois este composto liga-se irreversivelmente a cisteínas reduzidas, enquanto as cisteínas que se encontravam oxidadas foram reduzidas com DTT e alquiladas com IAM, antes de serem analisadas por espectrometria de massa.

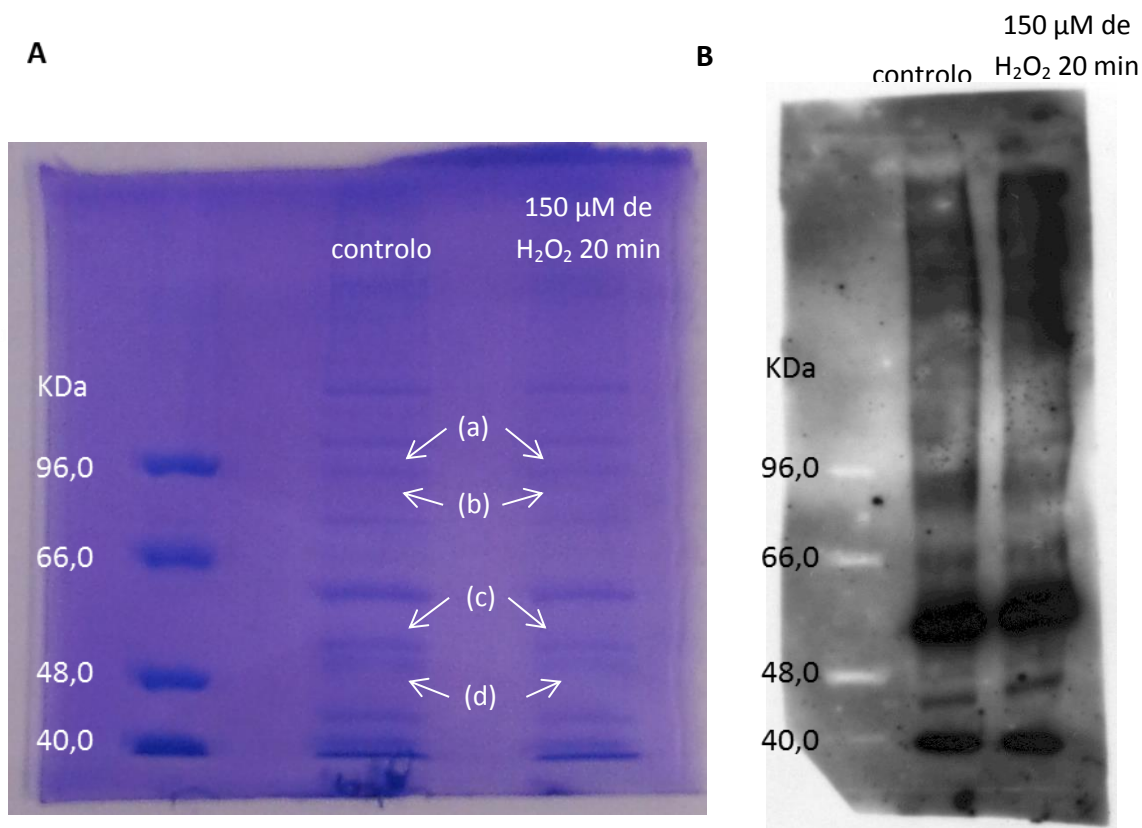


Figura 13 – Análise das proteínas membranares, após imunoprecipitação com anti-GFP, das células tratadas e não tratadas com 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário. (A) – Gel de SDS-PAGE, corado com solução de azul de Coomassie R250 das amostras imunoprecipitadas. As bandas marcadas (a) a (d) correspondem às bandas analisadas por espectrometria de massa (B) – Resultado do *Western Blot* de parte do gel anterior, após transferência para uma membrana de nitrocelulose e ligação com o anticorpo anti-GFP. Os resultados apresentados provêm de uma única experiência efectuada nas condições descritas nos Materiais e Métodos (III.3.9).

Após a imunoprecipitação das proteínas membranares das células controlo e tratadas com 150 μ M de H_2O_2 em estado estacionário esperava-se que existisse apenas uma banda na zona onde deveria separar-se a Itr1-GFPp. Como podemos observar na Figura 13A, obtiveram-se múltiplas bandas através da imunoprecipitação realizada, além da banda que deveria aparecer na zona de separação da Itr1-GFPp não estar muito

enriquecida. A existência de outras bandas que não a banda na zona de separação da Itr1-GFPp poderá dever-se a uma hidrólise parcial da Itr1-GFPp contendo o epítipo de ligação do anticorpo anti-GFP. Estas bandas podem também dever-se ao facto do método de imunoprecipitação ainda não estar optimizado, e assim, haver coimunoprecipitação de outras proteínas durante o processo. Esta inexistência de optimização pode também ser a causa da falta de enriquecimento da banda correspondente ao Itr1-GFPp pela ligação do anticorpo anti-GFP.

Algumas bandas do gel obtido foram extraídas e submetidas a espectrometria de massa. Foram escolhidas quatro bandas de cada amostra para analisar por espectrometria de massa. As bandas (a) e (b) localizam-se na zona do gel onde deverá separar-se a Itr1-GFPp. As bandas (c) e (d) foram escolhidas também pelo facto do *Western Blot* realizado mostrar a existência de fluorescência naquela zona do gel, resultante da ligação do anticorpo anti-GFP nessa zona. Uma vez retiradas as 4 bandas, estas foram processadas noutro laboratório (pelo Doutor Gonçalo Costa) e feita a análise por espectrometria de massa. Apenas se obtiveram resultados para a banda (a), correspondente à amostra tratada com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min (Quadro 4). A banda (a) da amostra controlo não produziu resultados provavelmente devido a uma quantidade insuficiente de Itr1-GFPp para a análise por espectrometria de massa.

Quadro 4 – Resultados de espectrometria de massa da banda (a) da amostra tratada com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min. Neste quadro encontram-se apresentados os péptidos obtidos por digestão com tripsina da banda (a) da amostra tratada com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, a massa prevista de cada péptido, a massa obtida após modificação, a posição do péptido na proteína e as modificações encontradas nos resíduos de cisteína. NAM – ligação com NEM; CAM – ligação com iodoacetamida (IAM)

Sequência do péptido	Massa prevista (Da)	Massa obtida (Da)	Posição na proteína	Modificações
ILVGLSCRIPTAVQFTCL CFLPDTPR	2707.4019	3079.7758	247-272	Cys_NAM: 262, 264
TILLOGLPGMTMALVV CSIAFHFLGIK	2858.6108	2915.6323	401-427	Cys_CAM: 417
TILLOGLPGMTMALVV CSIAFHFLGIK	2858.6108	2982.7361	401-427	Cys_NAM: 417

No Quadro 4 encontram-se representados os resultados obtidos pela hidrólise da banda (a) correspondente à amostra tratada com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min. Foi apenas possível obter resultados para as cisteínas Cys262, Cys264 e Cys417.

É possível observar que as cisteínas Cys262 e Cys264 se encontram reduzidas, pois estão ligadas ao NEM (Cys_NAM). Já no caso da cisteína Cys417 existe uma mistura, pois tanto existe a cisteína no estado oxidado (ligada ao IAM (Cys_CAM)) como reduzido (ligada a NEM (Cys_NAM)). Esta observação está de acordo com os resultados obtidos no ponto **IV.5.** pois indicia que existe uma mistura de proteína Itr1-GFPp com cisteínas oxidadas e reduzidas devido à acção de 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min.

No entanto, face à inexistência de dados da banda (a) da amostra controlo, da falta de péptidos que contenham todas as cisteínas presentes na proteína Itr1-GFPp e do número de experiências realizado, não é possível concluir de um modo absoluto que 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min vai oxidar alguns resíduos de cisteína na Itr1-GFPp e, no caso de isso acontecer, quais os resíduos de cisteína que se encontram oxidados em amostras controlo e amostras tratadas nestas condições.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objectivo do presente trabalho centrou-se no estudo dos transportadores de inositol de *S. cerevisiae*, Itr1p e Itr2p, nomeadamente ao nível do seu conteúdo membranar e total na célula, a sua localização celular e o estado de oxidação dos seus resíduos de cisteína durante o período de adaptação a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário. Anteriormente já foi observado no nosso laboratório que, em condições de adaptação semelhantes às utilizadas no presente trabalho (150 μM de H_2O_2 em estado estacionário) os níveis de inositol intracelular diminuíam (Cepeda 2010). Como hipótese de trabalho propôs-se que a acção de 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário modifica os transportadores de inositol, Itr1p e Itr2p, levando a uma acumulação dos transportadores na membrana plasmática e à diminuição do *uptake* exógeno de inositol, mecanismo responsável pela diminuição do inositol intracelular.

Para responder à hipótese de trabalho propôs-se determinar os níveis membranares e totais dos transportadores de inositol de *S. cerevisiae*, Itr1-GFPp e Itr2-GFPp. Apesar do método utilizado para a quantificação do transportador Itr2-GFPp não tenha sido o melhor, pois não apresenta a sensibilidade adequada à quantidade presente desta proteína nas células de *S. cerevisiae*, os resultados obtidos para a Itr1-GFPp estão de acordo com a hipótese proposta. Na verdade o transportador Itr1-GFPp acumula-se na membrana sendo a sua internalização inibida. É de notar que esta acumulação da proteína Itr1-GFPp na membrana plasmática não resulta de um aumento da síntese *de novo* da proteína, dado que foi visto no nosso laboratório (Cepeda 2010) que a expressão do gene *ITR1* diminui gradualmente ao longo do tempo até 40 minutos de tratamento das células nas condições anteriores. Esta acumulação pode, pois, dever-se a uma modificação na Itr1-GFPp induzida pelo H_2O_2 que impede a sua internalização. Já os níveis quer membranares quer totais de Itr2-GFPp mantêm-se inalterados, o que significa que a internalização desta proteína não é afectada pela presença do H_2O_2 . Os resultados obtidos por microscopia de fluorescência confirmam esta hipótese pois é possível visualizar e quantificar a acumulação da proteína Itr1-GFPp na membrana plasmática das células e a diminuição da internalização desta proteína em células tratadas com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 20 min. Lai e

colaboradores (1995) mostraram que na ausência de inositol há uma acumulação da Itr1p na membrana plasmática, havendo uma diminuição da internalização e degradação deste transportador. Como se propõe que o transportador Itr1p esteja modificado pela presença de H_2O_2 , inibindo o transporte de inositol, os resultados obtidos encontram-se de acordo com os resultados de Lai e colaboradores (Lai 1995), pois ao não existir o transporte de inositol não há internalização/degradação do transportador. No entanto estes resultados estão em desacordo com os resultados de Miyashita e colaboradores (Miyashita 2003) que não observaram uma diferença da localização celular da proteína Itr1-GFPp na presença ou ausência de inositol. Esta diferença deve-se provavelmente, como já foi referido, à utilização por parte dos autores de plasmídeos multicópia não contendo os elementos reguladores da Itr1p selvagem, ou seja, uma regulação pelo inositol.

Já no caso da Itr2-GFPp, os seus níveis membranares e totais encontram-se inalterados em condições de adaptação com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário. Apesar da grande homologia entre os dois transportadores, as diferenças estruturais causadas pela diferente sequência de aminoácidos levam a que os transportadores tenham diferentes afinidades para o inositol (Miyashita 2003). Assim, esta diferença estrutural e a inexistência da Cys262 em relação à Itr1-GFPp, podem ser a causa desta proteína não ser afectada pelo H_2O_2 .

Os resultados relativos à determinação dos níveis de oxidação da proteína Itr1-GFPp em condições de adaptação a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário não foram conclusivos. Face aos problemas já referidos com o método da reacção com MAL-PEG, nomeadamente com as dúvidas relativamente à adição do DTT, além da possível existência de uma oxidação parcial do conjunto de moléculas de Itr1-GFPp e ainda aliada ao facto de apenas existir uma experiência realizada, não é possível concluir que o H_2O_2 está a oxidar a proteína Itr1-GFPp. Também face aos resultados por imunoprecipitação e subsequente espectrometria de massa, não é possível tirar quaisquer conclusões. No entanto, os dados preliminares obtidos por espectrometria de massa indiciam que o resíduo Cys417 poderá ser um alvo de oxidação pelo H_2O_2 nas nossas condições experimentais. Relativamente aos resultados do estado de oxidação dos resíduos de cisteína da Itr1-GFPp, além de não terem sido conclusivos, não existe literatura para comparação dos resultados obtidos, pois trata-se de uma área não estudada da regulação desta proteína. Assim, é importante a realização de experiências

mais conclusivas sobre o estado de oxidação dos resíduos de cisteína da Itr1-GFPp de modo a compreender-se se a oxidação destes resíduos afecta o transporte e/ou internalização desta proteína.

Globalmente, os resultados obtidos neste trabalho apontam para que 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário tenham um efeito no principal transportador de inositol de *S. cerevisiae*, a Itr1p, apesar de ainda se desconhecer o mecanismo pelo qual esse efeito acontece.

VI. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos durante o presente trabalho experimental revelam-se importantes para a compreensão da resposta adaptativa a H_2O_2 , nomeadamente na regulação do conteúdo celular do principal transportador de inositol de *S. cerevisiae*, o Itr1p. No entanto, o processo de integração destes resultados no sentido de estabelecer uma ligação entre as alterações observadas e quaisquer modelos dos processos biológicos relacionados com o mecanismo de sobrevivência e resposta adaptativa a H_2O_2 em problemas ligados à saúde humana é sempre uma tarefa complexa. Assim é necessário complementar estes resultados com novas abordagens experimentais.

O principal objectivo deste projecto consistiu em estudar o mecanismo de regulação do transporte de inositol nas células de *S. cerevisiae* tratadas com 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, ao longo do tempo, até 20 minutos de tratamento. Neste contexto foi observada uma acumulação do transportador Itr1-GFPp na membrana plasmática das células, o que corresponde a uma diminuição da sua internalização e consequente degradação. No entanto, o mecanismo pelo qual a internalização deste transportador é inibida é ainda desconhecido. Seria interessante observar e compreender qual o mecanismo subjacente à inibição da internalização deste transportador. Sabe-se que a Art4 é activada por fosforilação (Pereira 2014). Também se sabe que em mamíferos o recrutamento de β -arrestinas é mediado por fosforilações através de cinases de receptores acoplados a proteínas G (Polo 2008). A observação do grau de fosforilação da Itr1p na ausência e presença de H_2O_2 poderia ajudar a perceber qual o mecanismo de internalização da Itr1p através da ligação da Art5 e de que maneira este mecanismo é afectado pela presença de H_2O_2 . Assim seria importante determinar os níveis de modificação pós-traducional da Itr1p após tratamento com H_2O_2 .

Uma das grandes limitações deste trabalho foi a inexistência de estruturas cristalográficas ou de NMR dos transportadores estudados, a Itr1p e Itr2p. Para perceber quais as diferenças estruturais entre os transportadores Itr1p e Itr2p que os levam a ter afinidades para o inositol distintas e um comportamento em resposta ao H_2O_2 também diferente, seria interessante determinar a sua estrutura tridimensional pelas técnicas acima referidas. Deste modo não seria necessário utilizar aproximações na determinação

da estrutura tridimensional, com todos os erros e incertezas que lhes estão associados, através de modelação por homologia. Através da determinação da estrutura tridimensional destas proteínas poder-se-ia compreender de que forma se dá a ligação da proteína adaptadora para ubiquitinação, neste caso a Art5, e quais os domínios da proteína envolvidos nesta ligação.

De modo a obter-se resultados mais fidedignos na quantificação de proteínas que existam em pouca quantidade, como é o caso da Itr2-GFPp em células *S. cerevisiae*, deveria utilizar-se um anticorpo específico de alta afinidade desta proteína de modo a obter-se melhores resultados por *Western Blot*. Desta forma seria possível assegurar que os níveis desta proteína se mantêm inalterados durante o processo de adaptação a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, confirmando assim o papel da Itr2-GFPp como transportador de inositol constitutivo (Nikawa 1993).

Uma vez que os resultados sobre o estado de oxidação dos resíduos de cisteína da Itr1-GFPp não foram conclusivos, será essencial determinar, pelas técnicas já utilizadas neste trabalho (tomando em atenção as críticas colocadas) ou por novas técnicas, quais os resíduos de cisteína que se encontram oxidados durante o processo de adaptação a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário (se for o caso) e qual o impacto desta modificação na actividade da proteína e na sua internalização.

Todos estes pontos devem ser tidos em conta em estudos futuros, de forma a compreender de um modo mais aprofundado os mecanismos associados à resposta adaptativa das células de *S. cerevisiae* a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, nomeadamente os mecanismos subjacentes à internalização e degradação da proteína Itr1p e transporte do inositol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abramoff** M. D., Magalhães, P. J, and Ram, S. J (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11 (7), 36-42
2. **Ammerer** G, Expression of genes in yeast using the ADCI promoter. *Methods Enzymol*. 1983;101:192-201
3. **Antunes** F, Cadenas E, Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state., *Free Radic Biol Med*. 2001 May 1;30(9):1008-18.
4. **Auerbach** D., Arnoldo A., Bogdan B., Fetchko M., and Stagljar I. (2005) Drug discovery using yeast as a model system: a functional genomic and proteomic view. *Current proteomics*. 2 (1), 1-13
5. **Barja** G., Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic Res Commun*. 1993;18(2):63-70.
6. **Belgareh-Touzé**, N. et al, Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking, *Biochem. Soc. Trans.* (2008) 36, 791–796
7. **Bjerrum** and Schafer-Nielsen (Analytical Electrophoresis, M. J. Dunn, ed., 1986, p. 315; Verlag Chemie, Weinheim
8. **Branco** M. R, Marinho H. S, Cyrne L, Antunes F, Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*., *Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):6501-6
9. **Cadenas**E. (1998) Mechanisms of Antioxidant Action. *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants*, Ozben, ed.Plenum Press. pp. 237-251.
10. **Cai** H, NAD(P)H Oxidase–Dependent Self-Propagation of Hydrogen Peroxide and Vascular Disease, *Circ Res*. 2005;96:818-822
11. **Carman** G. M, Han G, Phosphatidic Acid Phosphatase, a Key Enzyme in the Regulation of Lipid Synthesis, *J. Biol. Chem*. 2009, 284:2593-2597
12. **Carman** G. M, (2005) Regulation of phospholipid synthesis in yeast by zinc. *Biochem.Soc.Trans.* 33 (Pt5), 1150-1153
13. **Causton** H. C, Ren B, Koh S. S, Harbison C. T, Kanin E, Jennings E. G, Lee T. I, True H. L, Lander E. S, Young R. A, Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2001 Feb;12(2):323-37.
14. **Cepeda** A (2010), Estudo da regulação da expressão do sintase de ácidos gordos de *Saccharomyces cerevisiae* na aquisição da resistência ao peróxido de hidrogénio. Tese de Mestrado em Bioquímica – Bioquímica Médica, FCUL
15. **Chance** B, Sies H, Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 59 (3), 527-605.
16. **Cherry**, J. M (1995) Genetic nomenclature guide. *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet*. 11-12.
17. **Cohen** B. A, Pilpel Y, Mitra R. D, Church G. M., Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks., *Mol Biol Cell*. 2002 May;13(5):1608-14.
18. **Collinson** L. P, Dawes I. W, Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress, *J Gen Microbiol*. 1992 Feb;138(2):329-335.
19. **Costa** V. M, Amorim M. A, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P., Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7, *Free Radic Biol Med*. 2002 Dec 1;33(11):1507-15.

20. **Cunha**, M. L. (2001) Papel do glutationo na resposta ao stress oxidativo induzido pelo AAPH (dihidrocloreto de 2,2'azobis(2amidinopropano) em *Saccharomyces cerevisiae* na fase de crescimento exponencial e estacionária. Relatório de estágio científico da licenciatura em Bioquímica, FCUL
21. **Dujon** B, Albermann K, Aldea M, Alexandraki D, Ansorge W, Arino J, Benes V, Bohn C, Bolotin-Fukuhara M, Bordonné R, Boyer J, Camasses A, Casamayor A, Casas C, Chéret G, Cziepluch C, Daignan-Fornier B, Dang D. V, de Haan M, Delius H, Durand P, Fairhead C, Feldmann H, Gaillon L, Kleine K, et al., The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV., *Nature*. 1997 May 29;387(6632 Suppl):98-102.
22. **Finkel** T, Signal transduction by reactive oxygen species, *J. Cell Biol.* Vol. 194 No. 1 7–15 2011
23. **Flatt**, Patricia M, Mahmud T, Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds, *Nat. Prod. Rep.*, 2007,24, 358-392
24. **Forman** H. J, Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2007 April 1; 42(7): 926–932.
25. **Gasch** A. P, Spellman P. T, Kao C. M, Carmel-Harel O, Eisen M. B, Storz G, Botstein D, Brown PO., Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes., *Mol Biol Cell.* 2000 Dec;11(12):4241-57.
26. **Gaspar** ML, Aregullin MA, Jesch SA, Henry SA., Inositol induces a profound alteration in the pattern and rate of synthesis and turnover of membrane lipids in *Saccharomyces cerevisiae*., *J Biol Chem.* 2006 Aug 11;281(32):22773-85.
27. **Gerasimenko**, Julia V; et al; Bile Acids Induce Ca²⁺ Release from Both the Endoplasmic Reticulum and Acidic Intracellular Calcium Stores through Activation of Inositol Trisphosphate Receptors and Ryanodine Receptors; *J Biol Chem*; December 29, 2006; Volume 281: Pp 40154-40163.
28. **Giorgio** M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci P. G, Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 722-728 (September 2007)
29. **Goffeau** A, Barrell B. G, Bussey H, Davis R. W, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J. D, Jacq C, Johnston M, Louis E. J, Mewes H. W, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*. 274 (5287), 546, 563-7
30. **Godon** C, Lagniel G, Lee J, Buhler J. M, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano M. B, Labarre J, The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*., *J Biol Chem.* 1998 Aug 28;273(35):22480-9.
31. **Gralla**, E.(1997) Superoxide dismutase: Studies in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. 49 5-523.
32. **Grossmann** G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer W. B, Opekarová M, Tanner W, Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast, *J Cell Biol.* 2008 Dec 15;183(6):1075-88
33. **Hasan** R, Leroy C, Isnard A. D, Labarre J, Boy-Marcotte E, Toledano M. B., The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors., *Mol Microbiol.* 2002 Jul;45(1):233-41.
34. **Hitchcock** AL, Auld K, Gygi SP, Silver PA., A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 28;100(22):12735-40

35. **Holt** LJ, Tuch BB, Villén J, Johnson AD, Gygi SP, Morgan DO., Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution., *Science*. 2009 Sep 25;325(5948):1682-6
36. **Hu** Z, Killian P. J, Iyer V. R., Genetic reconstruction of a functional transcriptional regulatory network., *Nat Genet*. 2007 May;39(5):683-7
37. **Hudson**, J. R, Jr., Dawson, E. P., Rushing, K. L., Jackson, C. H., Lockshon, D., Conover, D., Lanciault, C., Harris, J. R., Simmons, S. J., Rothstein, R., and Fields, S. (1997) The complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form *Genome Res*. 7 (12), 1169-1173.
38. **Huh** W, Falvo J. V, Gerke L. C, Carroll A. S, Howson R. W, Weissman J. S, Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature* Vol 425, 16 October 2003, 686-691
39. **Jacq** C, Alt-Mörbe J, Andre B, Arnold W, Bahr A, Ballesta J. P, Barges M, Baron L, Becker A, Bateau N, Blöcker H, Blugeon C, Boskovic J, Brandt P, Brückner M, Buitrago M. J, Coster F, Delaveau T, del Rey F, Dujon B, Eide LG, Garcia-Cantalejo J. M, Goffeau A, Gomez-Peris A, Zaccaria P, et al, The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IV., *Nature*. 1997 May 29;387(6632 Suppl):75-8.
40. **Jamieson** D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14 (16), 1511-1527.
41. **Jesch** SA, Zhao X, Wells MT, Henry SA., Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast., *J Biol Chem*. 2005 Mar 11;280(10):9106-18
42. **Kukuljan** M, Vergara L, Stojilkovic SS (February 1997). "Modulation of the kinetics of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations by calcium entry in pituitary gonadotrophs". *Biophysical Journal* 72 (2 Pt 1): 698–707.
43. **Laemmli** U. K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685; 1970.
44. **Lai** K; McGraw P, Dual Control of Inositol Transport in *Saccharomyces cerevisiae* by Irreversible Inactivation of Permease and Regulation of Permease Synthesis by INO2, INO4, and OPI, *J. Biol. Chem*. 299, 3 January 21 1994, 2245-2251
45. **Lai**, K; Bolognese, C; Swift, S; McGraw, P, Regulation of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* involves inositol-induced changes in permease stability and endocytic degradation in the vacuole, *J. Biol. Chem*. 270, February 10 1995, 2525-2534
46. **Larner** J, D-Chiro-Inositol – Its Functional Role in Insulin Action and its Deficit in Insulin Resistance, *Int J Exp Diabetes Res*. 2002; 3(1): 47–60.
47. **Le Moan** N, Clement G, Le Maout S, Tacnet F, Toledano MB., The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways., *J Biol Chem*. 2006 Apr 14;281(15):10420-30
48. **Loewen** C. J., Roy A, Levine T. P. (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J*. 22 (9), 2025-2035.
49. **Loewen** C. J., Gaspar M. L., Jesch S. A., Delon C., Ktistakis N. T., Henry S. A., Levine T. P. (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*. 304 (5677), 1644-1647.

50. **Longo V. D**, Liou L. L, Valentine J. S, Gralla E. B, Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase., Arch Biochem Biophys. 1999 May 1;365(1):131-42.
51. **Michell R. H**, Inositol derivatives: evolution and functions., Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Feb;9(2):151-61
52. **Miyashita M**, Shugyo M, Nikawa J, Mutational Analysis and Localization of the Inositol Transporters of *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 96. No. 3,291-297. 2003
53. **Moradas-Ferreira P**, Costa V, Piper P and Mager W, The molecular defences against reactive oxygen species in yeast, Molecular Microbiology (1996) 19(4), 651–658
54. **Nikawa J**, Tsukagoshi Y, Yamashita S, Isolation and Characterization of Two Distinct myo-Inositol Transporter Genes of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 266, June 15 1991, 11184-11191
55. **Nikawa J**, Hosaka K, Yamashita S, Differential regulation of two myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*, Molecular Microbiology (1993) 10(5), 955-961
56. **Nikko E**, Pelham H. R. B, Arrestin-Mediated Endocytosis of Yeast Plasma Membrane Transporters, Traffic 2009;10:1856–1867
57. **de Oliveira-Marques V**, Cyrne L, Marinho H. S, Antunes F., A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha, J Immunol. 2007 Mar 15;178(6):3893-902.
58. **de Oliveira-Marques V**, Marinho H. S, Cyrne L, Antunes F, Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator., Antioxid Redox Signal. 2009 Sep;11(9):2223-43
59. **Pedroso N**, Matias A. C, Cyrne L, Antunes F, Borges C, Malhó R, de Almeida R. F, Herrero E, Marinho H. S., Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*., Free Radic Biol Med. 2009 Jan 15;46(2):289-98
60. **Pereira C**, Pereira, A.T, Osório H, Moradas-Ferreira, P, Costa, V. Role of Sit4p-dependent protein dephosphorylation in the regulation of the mitochondrial function and yeast lifespan. Apresentação oral (Pereira A.T) nas XX Jornadas Van Uden realizadas em Julho de 2014 no Instituto Superior Técnico em Lisboa.
61. **Perrone G. G**, Tan S, Dawes I. W, Reactive oxygen species and yeast apoptosis, Biochimica et Biophysica Acta 1783 (2008) 1354–1368
62. **Polo S**, Di Fiore P. P, Finding the Right Partner: Science or ART?, Cell 135, November 14, 2008, 590-592
63. **Pulloor NK**, Nair S, Kostic AD, Bist P, Weaver JD, et al. (2014) Human Genome Wide RNAi Screen Identifies an Essential Role for Inositol Pyrophosphates in Type-I Interferon Response. PLoS Pathog. 2014 Feb,27 10(2): e1003981
64. **Rapiejko PJ**, Northup JK, Evans T, Brown JE, Malbon CC (November 1986). "G-proteins of fat-cells. Role in hormonal regulation of intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate". The Biochemical Journal 240 (1): 35–40.
65. **Rines D. R**; Thomann D; Dorn J. F; Goodwin P; Sorger P. K Live Cell Imaging of Yeast. Cold Spring Harb Protoc, 2011
66. **Robinson K. S**, Lai K, Cannon T. A, McGraw P, Inositol Transport in *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by Transcriptional and Degradative Endocytic Mechanisms during the Growth Cycle that Are Distinct from Inositol-induced Regulation, Molecular Biology of the Cell Vol. 7, 81-89, January 1996

67. **Schweizer** E, Hofmann J., Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems., *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Sep;68(3):501-17
68. **Shen**, X.; Xiao, H; Ranallo, R; Wu, WH; Wu, C (2003). Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* 299 (5603): 112–4.
69. **Sherman**, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41.
70. **Sies** H, Oxidative stress: oxidants e antioxidants, *Experimental Physiology* (1997), 82, 291-295
71. **Snyder** M, Kumar A, Yeast genomics: past, present, and future promise, *Funct Integr Genomics* (2002) 2:135–137
72. **Sousa-Lopes**, A, Antunes, F, Cyrne, L, Marinho, H. S (2004) Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett.* **578**, 152-156
73. **Suzuki** Y. J, Forman H. J, Sevanian A., Oxidants as stimulators of signal transduction., *Free Radic Biol Med.* 1997;22(1-2):269-85.
74. **Temple** M. D, Perrone G. G, Dawes I. W, Complex cellular responses to reactive oxygen species, *Trends Cell Biol.* 15 (6), 319-326, 2005
75. **Toledano** M. B, Delaunay A, Biteau B, Spector D, Azevedo D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. in *Topics in Current Genetics*, Springer-Verlag. 241-303
76. **Tsukimori** K, Fukushima K, Tsushima A, Nakano H, Generation of Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Endothelial Cell Injury in Normal and Preeclamptic Pregnancies, *Hypertension* 2005;46:696-700
77. **Vizoso-Vazquez** A et al. (2012) Ixr1p and the control of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic response. *Appl Microbiol Biotechnol* 94(1):173-84
78. **Zhang D. X**, Gutterman D. D, Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2023–H2031, 2006